

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 6 月 30 日 (30.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/059141 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/54, 9/10, A01H 5/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019461
- (22) 国際出願日: 2004 年 12 月 17 日 (17.12.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2003-420046
2003 年 12 月 17 日 (17.12.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒5308203 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 4 0 号 Osaka (JP). サントリーフラワーズ株式会社 (SUNTORY FLOWERS LIMITED) [JP/JP]; 〒1020093 東京都千代田区平河町二丁目 1 3 番 1 2 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田中 良和 (TANAKA, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒5200246 滋賀県大津市仰木の里 2 - 7 - 4 Shiga (JP). 小埜 栄一郎 (ONO, Eiichiro) [JP/JP]; 〒5200844 滋賀県大津市国分 2 - 9 3 1 - 3 Shiga (JP). 中村 典子 (NAKAMURA, Noriko) [JP/JP]; 〒6048456 京都府京都市中京区西ノ京壺ノ内町 2 - 1 6 Kyoto (JP). 水谷 正子 (MIZUTANI, Masako) [JP/JP]; 〒6158086 京都府京都市西京区桂乾町 5 3 - 6 0 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 青木 篤, 外(AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目 5 番 1 号 虎ノ門 3 7 森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF CONSTRUCTING YELLOW FLOWER BY REGULATING FLAVONOID SYNTHESIS SYSTEM

(54) 発明の名称: フラボノイド合成系の制御による黄色の花の作製方法

(57) Abstract: It is intended to provide genes respectively encoding the amino acid sequences represented by SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:70. By simultaneously expressing these 4' CGT gene and AS gene in a plant inherently having no ability to synthesize aurones, aurones can be successfully accumulated and the flower color of the plant turns yellowish. By expressing these genes and, moreover, regulating the flavonoid colorant synthesis system of the host plant per se, a flower in an improved vivid yellow color can be obtained.

(57) 要約: 例えば、配列番号: 2 または配列番号 70 に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子を提供する。この 4' CGT 遺伝子と AS 遺伝子を、本来オーロン類合成能のない植物において共発現することにより、オーロン類を蓄積することに成功し、花色が黄色味を帯びた色に変化した。さらに、両遺伝子の発現に加えて、宿主植物自身のフラボノイド色素合成系を制御することで、より鮮明な黄色の花を得ることができた。



WO 2005/059141 A1

明 細 書

フラボノイド合成系の制御による黄色の花の作製方法

技術分野

本発明はカルコン類に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、および当該遺伝子を利用して花色が変換された植物に関するものである。更に詳しくは、カルコン類の4' 位配糖体を合成する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、好ましくはゴマノハグサ科由来の、より好ましくはキンギョソウあるいはリナリア由来のカルコン類の4' 位配糖体を合成する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、及びこれらの遺伝子とオーレウシジン合成酵素（以下、ASという）遺伝子を単独または同時に発現させカルコン類またはオーロン類を蓄積させることにより花の色を改変する手法、好ましくは黄色く改変する手法に関するものである。

背景技術

花色は人が花卉を鑑賞あるいは購入する際に重要な形質であり、古くから様々な色の花が育種されてきた。単一の種ですべての色の花をもつ場合はむしろ稀であるが、これは花色として発現する色素の生合成が遺伝的に規定されていることによる。交配育種では利用できる遺伝子資源が交配可能な近縁種に限定されているため、交配によって目的の種においてすべての色の花を作るとは実質的に不可能であった。最近になって、遺伝子組換え技術を利用して、花色素を合成する遺伝子のある植物から取得し、当該遺伝子を別の種で発現することにより花の色を改変することが可能となった(Plant Cell Physiol. 39,1119 (1998)、Curr. Opin. Biotechnol. 12, 155

(2001))。

花の色のうち、橙、赤、紫、青は主にアントシアニンと総称されるフラボノイドに由来する。黄色は、カロチノイド、ベタレインといったフラボノイド以外の化合物に由来することが多いが、一部の植物種の黄色はフラボノイドに由来する。たとえば、黄色カーネーションには4,2',4',6' - テトラヒドロキシカルコン (以下THC) の2' 位配糖体が花卉中に存在することが知られている (Phytochemistry 5,111 (1996))。また、キンギョソウ、リナリアにはTHCの4' 位配糖体が存在する。

カルコン類としては、THCのほか、ブテイン、イソリクイチゲニン等及びこれらの誘導体の配糖体が知られており、カーネーション、アサガオ、ボタン、アスター、ムギワラギク、ニチニチソウ、シクラメン、ペチュニアはTHC、キンギョソウやスターチスは3,4,2',4',6' - ペンタヒドロキシカルコン (PHC)、コスモス、キクイモはブテイン、ダリアはブテインおよびイソリクイチゲニンをアグリコンとする配糖体を含んでいる。また、キンギョソウ、リナリア、アサガオなどの限られた種にはオーレウシジン(以下AU)、ブラックテアチンなどのオーロン類と呼ばれる黄色の花色素が存在する。

オーロンの吸収極大は399nmから403nmであるのに対し、カルコンの吸収極大は372nmから382nmであるから、両者の色調は異なり、蛍光のためオーロンのほうが鮮やかな黄色を呈する (バイオホルティ

1 49-57 (1990) 誠文堂新光社)。一般にカルコン類、オーロン類、アントシアニンは植物細胞中では配糖体として液胞中に蓄積する。アントシアニンの生合成経路はよく研究されており、アントシアニンの合成に関与する酵素やそれらをコードする遺伝子が知られている (Comprehensive Natural Products Chemistry, vol I (ed. Sankawa) pp713-748, Elsevier, Amsterdam(1999))。

フラボノイドの生合成経路は高等植物には広く存在しており、また、種間で共通している。THCは、3分子のマロニルCoAと1分子のクマロイルCoAからカルコン合成酵素の触媒作用により生合成される。THCは薄い黄色を呈するが、植物細胞内では、通常カルコン異性化酵素（CHI）により速やかに無色のナリングニンに変換される。また、THCは中性付近のpHではきわめて不安定であり、自発的に閉環してナリングニンに変換する。THCが植物細胞中で安定に存在、すなわち黄色を安定に呈するためには、THCの2'位が糖により修飾され閉環できなくなることが必要である。この反応はTHCの2'位にグルコースを転移する酵素（UDP-グルコース：4,2',4',6'-テトラヒドロキシカルコン 2'位-糖転移酵素 以下2'CGT）により触媒される。

THC 2'位配糖体はカーネーション、シクラメンなどに存在することから、2'CGTもこれらの花に存在すると予測される。したがって、2'CGT遺伝子を得る事ができれば、この酵素遺伝子を植物において発現し、THC 2'位配糖体を蓄積させ、黄色の花を作成できると考えられていた（*Biotechnology of Ornamental Plants*, Edited by Geneve, Preece and Merkle, pp259-294, CAB International Wallingford, UK (1997)）。また、THC 2'位配糖体を十分蓄積し黄色を発色させるためにはCHI遺伝子が欠損し、THCからナリングニンへの酵素的変換が抑制されること、さらに明瞭な黄色の発色のためにはCHI遺伝子と他にフラバノン3-水酸化酵素（以下、F3Hという）遺伝子も欠損する必要があることが知られていた（*Plant Cell Physiology*. 43, 578 (2002)）。

これまでにカーネーションの2'CGT遺伝子をクローニングしたという報告はある（*Plant Cell Physiology*. 44, s158 (2003)）がその配列は開示されていない。また、カーネーションから2'CGT活性を

コードする遺伝子を取得し、ペチュニアで発現させ、ペチュニア花弁においてTHC 2' 位配糖体を蓄積した例もある (PCT/JP03/10500)。しかしながら、2' CGTによって生成するTHC 2' 位配糖体は、その化学構造上、オーロン合成の前駆体となることが不可能となる。また、前述のようにTHC 2' 位配糖体の蓄積では、うすい黄色の花弁にしかない。

THCの2' 位の水酸基がメチル化された化合物が蓄積した場合も花弁は淡い黄色となることは知られているが、このメチル化を触媒する酵素やその遺伝子の実体は知られていない。ダリア、コスモスなどの黄色の品種には6' -デオキシカルコンが含まれる。マメ科植物においては、6' -デオキシカルコンは5-デオキシフラボノイドの前駆体であり、カルコンシンターゼ (CHS) とカルコンリダクターゼ (CHR) の触媒作用により生合成される。ペチュニアにアルファルフアのCHR遺伝子を導入したところ、ブテインなどの6' -デオキシカルコン類が生成したことが報告されているが、当該CHR遺伝子を白い花をもつペチュニアに導入した場合、つぼみの段階ではごく薄い黄色が見られたが、開花時にはほとんど白であり、産業上有用な黄色の花を作出するに至らなかった (Plant J. 13, 259 (1998))。

前述のようにカルコン配糖体よりもオーロンのほうが鮮やかな黄色を呈するため、オーロンを蓄積させる方法を開発できれば産業上きわめて有用である。オーロンの生合成に関わる酵素の1つであるASとその遺伝子については既に報告されている (Science, 290, 1163 (2000))。この報告によればASはTHC、PHCや、これらの配糖体を基質としてAU、ブラクテアチンならびにこれらの配糖体を生成する。しかしながら、AS遺伝子を用いてAUやブラクテアチンなどのオーロンを生物において蓄積させた報告はない。

我々はAS遺伝子を構成的プロモーターの制御下に結合したバイナ

リーベクターを構築し、アグロバクテリウム法によりペチュニアやトレニアにAS遺伝子を導入したが、オーロンの蓄積は認められなかった。一方、アントシアニジンの3位の配糖化がアントシアニンの液胞への移行に必須であると報告されているが (Nature 375, 397 (1995))、これと同様にオーロンの配糖化が液胞への移行シグナルとして必須である可能性が考えられる。実際に黄色キンギョソウ花卉に蓄積している主要なオーロンはAUの6位の配糖体である。そこで、AUの6位に配糖化活性を示すGT (AU6GT) を取得し (WO 00/49155)、このAU6GT遺伝子とAS遺伝子を共にペチュニアで構成的に発現させたが、オーロンの蓄積は見られなかった。

フラボノイドやアントシアニンの生合成に関与する酵素は細胞内では細胞質か小胞体に存在すると考えられている。これらの酵素の働きでフラボノイドやアントシアニンは液胞の外側、すなわち細胞質側で合成され、配糖化された後、液胞に輸送される (Natural Product Reports 20, 288, (2003))。ところが、鋭意検討の結果、ASは例外的に液胞内に存在することを本発明者らは明らかにした。このことから生体内では、配糖化されたカルコンが液胞に輸送され、これを基質として液胞内でオーロンが合成されるのではないかという着想を得た。

前述のように黄色キンギョソウ花卉の液胞に蓄積する主要なオーロンはAU 6位配糖体である。AUの6位はTHCの4' 位に対応し、黄色キンギョソウ花卉にはTHC 4' 配糖体も存在する。これらに基づき、細胞質で合成されたTHCの4' 位が配糖化された後、液胞に輸送され、それを基質としてASによってAU 6位配糖体が合成されるという一連のオーロン合成経路を推測するにいたった。よってAU 6位配糖体などのオーロンを異種植物で合成させるためには、THC4' 位配糖体を合成することが必須であると考えた。そのためには、THCの4'

位を配糖化するUDP-グルコース：4,2',4',6' - テトラヒドロキシカルコン4' 位糖転移酵素、以下4' CGT)が必要であり、4' CGT遺伝子を取得する必要がある。しかしながら、4' CGT遺伝子は今までにクローニングされた報告もなく、4' CGTが単離された報告もない。

フラボノイドをはじめ多様な化合物の配糖化反応を触媒して配糖体を生成する酵素は、一般に糖転移酵素(GT)と呼ばれ、植物は、基質及び転移する糖の種類に対応した多様な分子種のGTおよびそれらをコードする遺伝子を持っている。GTは通常UDP-グルコースをグルコース供与体として利用するので、そのアミノ酸配列中にUDP-グルコースに結合するモチーフを含んでいる (Plant Physiol. 112, 446 (2001))。このモチーフを有するGT遺伝子は、すでにゲノムの全構造が明らかになっているアラビドプシスには99種あることが知られている (J. Biol. Chem. 276, 4338, (2001))。

また他の植物からも、いくつかのGTのアミノ酸配列と機能が解明されている。フラボノイドあるいはアントシアニジンの3位の水酸基に糖を転移する反応を触媒する酵素 (UDP-グルコース：フラボノイド3-糖転移酵素、以下3GT) の遺伝子は、シソ、トウモロコシ、リンドウ、ブドウなどから得られている (J. Biol. Chem. 274, 7405 (1999); J. Biol. Chem. 276, 4338, (2001))。また、アントシアニンの5位の水酸基に糖を転移する反応を触媒する酵素 (UDP-グルコース：アントシアニン5-糖転移酵素、以下5GT) の遺伝子は、シソ、バーベナなどから得られている (J. Biol. Chem., 274, 7405, (1999))。

3 GTや5GTのアミノ酸配列の解析から、同一機能を有するGTは植物種が異なってもアミノ酸配列は類似していること、すなわちファミリーを形成することが知られている (J. Biol. Chem. 276, 4

338, (2001))。よって、既知のGTと同一機能を有する酵素（オルソログ）を他の植物種から得る事は、現在の技術水準からすれば困難ではない。たとえば、ペチュニアの5GT遺伝子は、シソの5GT遺伝子を用いてクローニングされた（Plant Mol Biol. 48, 401 (2002)）。しかしながら、同一の機能を有する酵素が全く得られていない新規GT遺伝子の取得には多大の試行錯誤と困難が伴う。

前述のように全ゲノム構造が明らかになっているアラビドプシスであるが、その花卉は白く、カルコン4'位配糖体の蓄積は報告されていない。したがって、アラビドプシスのGT遺伝子の情報を利用して4'CGT遺伝子のクローニングを行うことはできない。また、カーネーションから2'CGTが単離（PCT/JP03/10500）されているが、4'CGT遺伝子と2'CGTの相同性が高いことは必ずしも期待できない。なぜならば、基質が共通であっても糖を付加する位置が異なれば、それぞれのGTの生化学的および分子生物学的特性は大きく異なる可能性が考えられるからである。これは、3GTと5GTが別のGTファミリーに属することによっても支持される。また、ベタニジンの5GTと6GTは基質が共通に関わらず、アミノ酸同一性は19%しかないことが報告されている（Planta 214, 492 (2002)）。

事実、共通のアントシアニン骨格の3位、5位または3'位に糖を転移する各GTは、GTスーパーファミリーの中の異なるファミリーに属し、これらのファミリー間のアミノ酸同一性は20%程度に過ぎない（Plant Physiol. 132, 1652, (2003), Natural Product Reports 20, 288, (2003)）。4'CGT遺伝子のみならず、新規の遺伝子を取得するには一般にいくつかの方法が考えられる。たとえば花卉で発現しているバラの香り成分の合成に関与する酵素の遺伝子は、遺伝子を網羅的に配列決定し、それらの構造、発現様式、大腸菌での発現によって同定された（Plant Cell. 14, 2325 (2002)）。

そこで4' CGT 遺伝子を同定するためにオーロンおよびカルコン4' 配糖体を蓄積する黄色キンギョソウ（品種バタフライイエロー）花卉由来のcDNAライブラリーからランダムに5000クローンを選び、これらの塩基配列を決定した。

公知のDNAデータベースを用いたホモロジー検索の結果、3種のGT遺伝子が得られた。そのうち2種は3GT遺伝子および前述の、AU6GTをコードする遺伝子（W0 00/49155）、残る1種が新規GT(pSPB662と命名)であった（配列番号：13）。しかし、pSPB662にコードされるGTはTHCに対する配糖化活性を示さず、4' CGTではないことが明らかとなった。また、前述のように同遺伝子とAS遺伝子とを共にペチュニアにおいて高発現させた結果、カルコン配糖体およびオーロンの生成は確認されず、花色についても変化は認められなかった。これらの結果から、5000クローン程度のランダムスクリーニングによってはカルコン配糖化酵素遺伝子を単離できないことが示唆され、4' CGT 遺伝子を取得するのは、困難であった。

特許文献 1 PCT/JP03/10500

特許文献 2 W0 00/49155

非特許文献 1 Plant Cell Physiol. 39,1119 (1998)

非特許文献 2 Curr. Opin. Biotechnol. 12, 155 (2001)

非特許文献 3 Phytochemistry 5,111 (1996)

非特許文献 4 バイオホルティ 1 49-57 (1990) 誠文堂新光社

非特許文献 5 Comprehensive Natural Products Chemistry, vol 1 I (ed. Sankawa) pp713-748, Elsevier, Amsterdam(1999)

非特許文献 6 Biotechnology of Ornamental Plants, Edited by Geneve, Preece and Merkle, pp259-294, CAB International Wallingford, UK (1997)

- 非特許文献 7 Plant Cell Physiol. 43, 578 (2002)
- 非特許文献 8 Plant Cell Physiol. 44, s158 (2003)
- 非特許文献 9 Plant J. 13, 259 (1998)
- 非特許文献 10 Science, 290, 1163 (2000)
- 非特許文献 11 Nature 375, 397 (1995)
- 非特許文献 12 Natural Product Reports 20, 288, (2003)
- 非特許文献 13 Plant Physiol. 112, 446 (2001)
- 非特許文献 14 J. Biol. Chem. 276, 4338, (2001)
- 非特許文献 15 J. Biol. Chem. 274, 7405 (1999)
- 非特許文献 16 Plant Mol Biol. 48, 401 (2002)
- 非特許文献 17 Planta 214, 492 (2002)
- 非特許文献 18 Plant Physiol. 132, 1652, 2003 (2003)
- 非特許文献 19 Plant Cell. 14, 2325 (2002)

発明の開示

本発明は、カルコン類の4' 位の水酸基に糖を転移する活性を有するタンパク質及びその遺伝子、好ましくはカルコン類の4' 位の水酸基に特異的に糖を転移する活性を有するタンパク質及びその遺伝子を提供することにある。さらに当該GT遺伝子を用いて花色を改変、好ましくは黄色に変化させた植物体を提供することにある。

前述のように、4' CGTの生化学的あるいは分子生物学的な性質は知られておらず、酵素が精製されたり、その遺伝子がクローニングされたこともなかった。発明者らは、黄色キンギョソウ（バタフライイエロー）の花弁cDNAライブラリーからGTファミリーの保存アミノ酸配列に対応した塩基配列を有するプローブを用いて、当該保存アミノ酸配列の塩基配列を有するGT遺伝子を十種類取得した。さらに、当該GT遺伝子群を各々大腸菌で発現させ、その中に、当該大腸

菌の抽出液中にカルコンの4' 位にグルコースを転移する活性、すなわち4' CGT活性を確認し、クローン化した遺伝子が4' CGTをコードすることを確認した。この遺伝子を植物中で発現させ、花色を改変し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、（１）カルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を提供する。

本発明はまた、（２）配列番号２に記載のアミノ酸配列を有する前記（１）記載の遺伝子を提供する。

本発明はまた、（３）配列番号１に記載する塩基配列の一部または全部に対して、5 x SSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする前記（１）記載の遺伝子を提供する。

本発明はまた、（４）配列番号２に記載のアミノ酸配列に対して１個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換によって修飾されているアミノ酸配列を有し、カルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする前記（１）に記載の遺伝子を提供する。

本発明はまた、（５）配列番号１に記載する塩基配列の一部または全部からなるDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする前記（１）記載の遺伝子を提供する。

本発明はまた、（６）ゴマノハグサ科由来である前記（１）～（５）のいずれか１項に記載の遺伝子を提供する。

本発明はまた、（７）前記（１）～（６）のいずれか１項に記載の遺伝子を含んでなるベクターを提供する。

本発明はまた、（８）前記（７）に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞を提供する。

本発明はまた、(9) 前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子によってコードされるタンパク質を提供する。

本発明はまた、(10) 前記(7)に記載の宿主細胞を培養し又は生育させ、当該宿主細胞からカルコン類の4'位に糖を転移する活性を有するタンパク質を採取することを特徴とする該タンパク質の製造方法を提供する。

本発明はまた、(11) 前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子が導入された植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体、またはそれら植物体の組織を提供する。

本発明はまた、(12) 前記(11)に記載の植物体の切り花を提供する。

本発明はまた、(13) 前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子を用いてカルコン類の4'位に糖を転移する方法を提供する。

本発明はまた、(14) 前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子を植物体に導入・発現して得られる、花色が改変された当該植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体を提供する。

本発明はまた、(15) 花色が黄色味を帯びていることを特徴とする前記(14)に記載の植物体を提供する。

本発明はまた、(16) 前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、花色を黄色く改変させる方法を提供する。

本発明はまた、(17) 前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラボノイド合成系遺伝子の発現

を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法を提供する。

本発明はまた、(18) 前記 (1) ~ (6) のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法を提供する。

本発明はまた、(19) 前記 (1) ~ (6) のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラバノン3-水酸化酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、植物における典型的なフラボノイド合成経路を示す。ここに記載された酵素遺伝子の有無により植物種ごとに代謝経路の末節は異なる。たとえば、黄色のキンギョソウ花卉においてはアントシアニン合成経路と共にオーロン合成に至る経路も存在するが、同じゴマノハグサ科の植物であるトレニアは、4' CGT、AS遺伝子を有しないため、オーロン類を合成することは出来ない。図中の略称については以下参照。CHS, カルコン合成酵素; CHI, カルコン異性化酵素; F3H, フラバノン 3-水酸化酵素; DFR, ジヒドロフラボノール4-還元酵素; ANS, アントシアニン合成酵素; 3GT, UDP-グルコース:アントシアニン 3-配糖化酵素; FLSフラボノール合成酵素; FNS, フラボン合成酵素; F3' H, フラボノイド 3'-水酸化酵素; F3' , 5' H, フラボノイド 3' , 5' -水酸化酵素; 2' CGT, UDP-グルコース:4, 2' , 4' , 6' -テトラヒドロキシカルコン 2' 位糖転移酵素; 4' CGT, UDP-グルコース: 4, 2' , 4' , 6' -テトラヒド

ロキシカルコン 4' 位糖転移酵素；AS，オーレオシジン合成酵素

図2は、図1の続きである。

図3は、形質転換体トレニアのサザンハイブリダイゼーションの結果を示す。pSFL201、pSFL307、pSFL308導入の形質転換体トレニア(品種サマーウェーブブルー)葉よりゲノムDNAを抽出し、KpnI切断後、4' CGT遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションに供した。各レーンの上の数字は導入遺伝子コンストラクトおよび形質転換体系統番号を記す。SWBは宿主として用いたサマーウェーブブルーである。M1、M2はDIGラベルしたサイズマーカー(ロシユ)であり、各バンドのサイズを図の左右に記す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の遺伝子としては、例えば配列番号2に記載したアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。しかしながら、複数個のアミノ酸の付加、欠失または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質も、もとのタンパク質と同等の酵素活性を維持することが知られている。従って本発明は、4' CGT活性を保持しているタンパク質である限り、配列番号2に記載のアミノ酸配列に対して1個または複数個のアミノ酸配列の付加、欠失および/または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質および当該タンパク質をコードする遺伝子も本発明に属する。なお、複数個とは、2～30個、好ましくは2～9個をいう。

本発明はまた、配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAに対し、5xSSC、50℃といった比較的温和な条件下でハイブリダイズし、かつ4' CGT活性を有するタンパク質をコードする遺伝子に関するものである。さらに、配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAに対

しストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ4' CGT活性を有するタンパク質をコードする遺伝子も、本発明の技術的範囲に属する。ここでいうストリンジェントな条件とは、例えば2 x SSC、65°Cがあるが、ハイブリダイゼーションの条件はプローブに用いるDNAの長さ及び塩基組成によって異なるから、この条件に限定されない。

上述のようなハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子としては、天然由来のもの、例えば植物由来のもの、好ましくはゴマノハグ科由来のもの、さらに好ましくはキンギョソウ、リナリア、ウンラン由来の遺伝子が挙げられるが、植物由来に限定されるものではない。すなわち、本発明の4' CGT遺伝子は、キンギョソウ、リナリア、ウンラン由来の4' CGT遺伝子に限定されるものではなく、カルコン類4' 位配糖体を含む他の生物種に由来する4' CGT遺伝子であれば、いずれでも黄色の花を育種するのに用いることができる。4' CGT遺伝子を含む合成DNAも、植物由来の遺伝子と同様に用いることができる。

また、ハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子はcDNAであってもよく、ゲノムDNAであってもよい。

GTの保存領域の相同性を有する遺伝子は実施例に示すように、例えばキンギョソウやリナリア花卉から作製したcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。また、配列番号2に記載のアミノ酸配列が改変されたアミノ酸配列を有するGTをコードするDNAは、配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAを用いて、公知の部位特定変異誘発法やPCR法を用いて合成することができる。例えばアミノ酸配列を改変したいDNA断片をcDNAまたはゲノムDNAの制限酵素処理によって得、これを鋳型にして、所望のアミノ酸配列の改変に対応したプライマーを用い、部位特異的変異誘発またはPCR

法を実施し、所望のアミノ酸配列の改変に対応したDNA断片を得ることができる。その後、この改変を導入したDNA断片を目的とする酵素の他の部分をコードするDNA断片と連結すればよい。このようなDNAを化学的に合成することもできる。

あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAを得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNAを所望の制限酵素により切断し、その結果得られたDNA断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合は、不足部分のアミノ酸配列に対応するDNA断片を合成し、連結すればよい。

このようにして得られたGT遺伝子は大腸菌又は酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、当該大腸菌又は酵母の抽出液中の4' CGTの活性を測定することにより、得られたGT遺伝子が4' CGTを示すタンパク質をコードすることを確認することができる。4' CGTの活性は、例えば実施例3に記載したように、逆相樹脂に4' CGTの基質となるカルコン類を吸着させ後、当該逆相樹脂をGT遺伝子で形質転換した大腸菌又は酵母の抽出液と反応させ、生成したカルコン4' 配糖体を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析することにより測定できる。

さらに、得られた4' CGT遺伝子を適切な宿主細胞で発現させることにより、当該遺伝子の産物である4' CGTタンパク質を得ることができる。あるいはまた、配列番号2に記載のアミノ酸配列の全部又は一部を有するタンパク質又はペプチドに対する抗体を用いて他の生物の4' CGT遺伝子を発現クローニングによって得ることもできる。

本発明はまた、4' CGT遺伝子を含む組換えベクター、特に発現ベクター、及び当該ベクターによって形質転換された宿主細胞に関する

るものである。宿主としては、原核生物または真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、例えばエシェリヒア (*Escherichia*) 属に属する細菌、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*)、バシルス (*Bacillus*) 属微生物、例えばバシルス・スブシルス (*Bacillus subtilis*) など従来公知の宿主細胞を用いることができる。

真核細胞としては、例えば真核微生物、好ましくは酵母または糸状菌が使用できる。酵母としては例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等のサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属酵母が挙げられ、また糸状菌としては、例えばアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 等のアスペルギルス (*Aspergillus*) 属微生物、及びペニシリウム (*Penicillium*) 属微生物等が挙げられる。さらに動物細胞または植物細胞も宿主細胞として使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに昆虫細胞、例えばカイコ細胞、またはカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

本発明の発現ベクターはそれらを導入すべき宿主の生物種に依存したプロモーターおよびターミネーター等の発現制御領域、及び複製起点等を含む。細菌用、特に大腸菌における発現ベクターのプロモーターとしては、従来公知のプロモーター、例えば *trc* プロモーター、*tac* プロモーター、*lac* プロモーター等が使用できる。また、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、*PH05* プロモーター等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては例えばアミラーゼ、*trpC* 等のプロモーターが使用できるが、これらのプロモーターに限定されるものではない。また動物細胞用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えば *SV40* アーリープロモーター、*SV40* レートプロモーター

ター等が使用される。発現ベクターの作製は制限酵素、リガーゼ等を用いて常法に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主細胞の形質転換も従来公知の方法に従って行うことができる。

植物の発現ベクターの構築は、例えばアグロバクテリウムを用いる場合にはpBI121などのバイナリーベクターを、パーティクルガンを用いる場合にはpUC19などの大腸菌ベクターを用いることができる。さらに、当該植物の発現ベクターで形質転換された植物細胞を例えば抗生物質耐性遺伝子などのマーカー遺伝子を用いて選抜し、適切な植物ホルモン等の条件を用いて再分化させ、4' CGT遺伝子を導入した形質転換植物体を得ることができる。当該形質転換植物を栽培することにより、開花させ、花色が改変された植物体を得ることができる。

発現ベクターによって形質転換された宿主細胞又は形質転換植物体を培養又は栽培し、培養物等から常法に従って、例えば、濾過、遠心分離、細胞の破碎、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とする4' CGTタンパク質を回収、精製することができる。

本発明はキンギョソウやリナリアの4' CGT遺伝子のみに限定されるものではなく、4' CGTあるいは4' CGT遺伝子の起源としては、植物でも動物でも微生物でも合成したものであってもよく、4' CGT活性を有していれば同様に花色改変へ利用できる。本発明はまた、4' CGT遺伝子の利用に関するものであり、4' CGT遺伝子を植物体に導入・発現することにより、花色が改変された植物体もしくはその子孫の植物体もしくはこれらの植物の栄養増殖体又はこれら植物体の組織も本発明の技術的範囲であり、組織の形態としては切り花であってもよい。また4' CGT遺伝子のみでなく、4' CGT遺伝子に加え

AS遺伝子も共に植物体へ導入、発現させたり、さらに加えて、宿主が本来有するフラボノイド合成系遺伝子の発現を抑制することによって花色が改変された植物体もしくはその子孫の植物体もしくはこれらの植物の栄養増殖体またはこれら植物体の組織も本発明の技術範囲であり組織の形態としては切花であってもよい。

現在の技術水準をもってすれば、植物に遺伝子を導入し、その遺伝子を構成的あるいは組織特異的に発現させることは可能であるし、またアンチセンス法、コサプレッション法、RNAi法などによって目的の遺伝子の発現を抑制することも可能である。形質転換可能な植物の例としては、バラ、キク、カーネーション、金魚草、シクラメン、アサガオ、ペゴニア、インパチエンス、ゼラニウム、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミソウ、カランコエ、ユリ、ペラルゴニウム、ゼラニウム、ペチュニア、トレニア、チューリップ、イネ、レンギョウ、ペゴニア、オオムギ、小麦、ナタネ、ポテト、トマト、ポプラ、バナナ、ユーカリ、サツマイモ、タイズ、アルファルファ、ルーピン、トウモロコシ、カリフラワーなどがあげられるがこれらに限定されるものではない。

実施例

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法はとくに断らない限り、W096/25500あるいはMolecular Cloning(Sambrook et.al. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989)に記載されている方法に従った。

実施例 1. 黄色キンギョソウ花卉cDNA ライブラリーの構築

黄色のキンギョソウである品種バタフライイエローの新鮮な花卉5gから論文(Science 290, 1163 (2000))に記載のようにしてcDNAライブラリーを構築した。得られたライブラリーは、 1.6×10^5 pl

aque forming unitからなっていた。

実施例 2. 4' CGT遺伝子のスクリーニング 1

すでに開示されているGTのアミノ酸配列を比較し、これらのアミノ酸配列の保存領域に相当する塩基配列を増幅し、これをプローブとして実施例 1 で述べたキンギョソウ cDNA ライブラリーをスクリーニングした。

プローブに用いたGTはアサガオ由来のUDP-グルコース：アントシアニン3-グルコシド糖転移酵素 (3GGT) (特開2003-289884)、ペチュニア由来3GT (Plant Mol. Biol. 48, 401, (2002))、バーベナ由来5GT (J. Biol. Chem. 274, 7405 (1999))、コガネバナGT (SBGT, Planta 210, 1006 (2000))、リンドウ由来のUDP-グルコース：アントシアニン3'-糖転移酵素 (3' GT) (Plant Physiol. 132, 1652, (2003))配列の5種である。それぞれGTについて、保存された領域の配列を増幅できるように1組のオリゴヌクレオチドを合成した。これらオリゴヌクレオチドの配列を配列番号：3~12に示す。

アサガオ3GGT

配列番号 3 : 5' -GAA ATG GTC GGA TTG GCT GGG-3'

配列番号 4 : 5' -ACC TCC ACC CCA ACT TTC AGG-3'

ペチュニア3GT

配列番号 5 : 5' -GAT GCA TAA TTT GGC TAG AAA AGC-3'

配列番号 6 : 5' -CCA ATT TGC CAA ACA CTT TCC-3'

バーベナ5GT

配列番号 7 : 5' -TGC CTC GAA TGG TTG AGC ACG-3'

配列番号 8 : 5' -CTC TCA CTC TCA CAC CCG-3'

コガネバナGT

配列番号 9 : 5' -CAC GAA TGC TTA GCA TGG CTC-3'

配列番号 10 : 5' -CTT ATT GCC CAC TGA AAC CCC-3'

リンドウ3' GT

配列番号11 : 5' -TGT CTG AAT TGG CTT GAT TCC-3'

配列番号12 : 5' -AAC CCA CAG AAA CCC CTG TTC-3'

プローブはノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システム（ロシュ・ダイアグノスティックス）を用いて、製造者が推奨する条件に従いPCRによりラベルした。この際、鋳型として1 ngのそれぞれのcDNAを含むプラスミドを用い、プライマーとして、上記の各遺伝子特異的なオリゴヌクレオチド100ngを使用し、95℃1分、55℃1分、72℃2分からなる反応を1サイクルとし、これを25サイクル行った。各遺伝子のPCR増幅産物を等量混合したものをハイブリダイゼーションのプローブとして、実施例1に記載のキンギョソウ由来のcDNAライブラリーをスクリーニングした。

ハイブリダイゼーションは、30%ホルムアミド、1% SDSを含む5XSSC中、37℃で一晩行い、フィルターの洗浄は5x SSC, 1%SDSを用いて55℃で30分間行った。スクリーニングによるポジティブシグナルの検出はノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システム（ロシュ・ダイアグノスティックス）を用い、製造者の推奨する方法に従った。約30万プラークをスクリーニングし、最終的に10種類の完全長糖転移酵素遺伝子を含むクローンを得、これらをpSPB264,1621,1620,1622,1610,1609,1617,1615,660,658とした。DNA Sequencer model 3100 (Applied Biosystems)を用い、合成オリゴヌクレオチドプライマーによるプライマーウォーキング法によってこれらのcDNA配列を決定した。これらcDNAのアミノ酸コード領域の塩基配列を配列番号14～23に示した。

実施例3. 大腸菌を用いたカルコンGT活性の測定

3-1 大腸菌発現ベクターの構築と大腸菌におけるGTの発現

実施例2で得られた10種類のcDNAにコードされるGT活性を大腸菌

発現系を用いて解析した。まず、各 cDNA の大腸菌発現コンストラクトを作製した。PCR法によって各 cDNA の開始コドンと考えられる塩基配列 ATG に重なる様に NcoI サイトを導入し、開始メチオニンから終止コドンに至る領域を大腸菌発現ベクター pQE61 (QIAGEN) の NcoI および KpnI、または NcoI および EcoRV サイトに連結した。

開始メチオニンに重なる NcoI サイト導入のための PCR 液 (25 μ l) は、各 GT cDNA を鋳型とし、開始メチオニン部位に重なる NcoI 認識配列を導入したプライマー、及びストップコドン付近の 3' 側から 5' 側に向けてのプライマー各 0.2 pmol/ μ l, 1x ExTaq buffer (Takara), 0.2mM dNTPs, ExTaq polymerase 1.25 U からなる。反応は、94°C で 5 分反応させた後、94°C、1 分、55°C、1 分、72°C、2 分の反応を 28 サイクル行い、最後に 72°C で 5 分間処理した。得られた PCR 産物を pCR2.1 TOP0 vector (INVITROGEN) に製造者が推奨する方法でサブクローニングした。増幅された DNA 断片の DNA 配列を解析し、PCR によるエラーがないことを確認したのち、大腸菌発現ベクター pQE61 (QIAGEN) に導入した。

例えば pSPB1617 にコードされる cDNA (配列番号: 20) については、配列表に示した 1617BamHINcoI-FW (配列番号: 24) ならびに 1617XhoIKpnI-RV (配列番号: 25) の二種のプライマーを用いて PCR を行い、開始メチオニン部位に重なる NcoI サイトと、終始コドンの 3' 側に KpnI 認識配列を導入した。増幅された DNA 断片を pCR2.1 TOP0 vector にサブクローニングした。塩基配列に PCR によるエラーがないことを確認後、NcoI と KpnI で切り出した DNA 断片を pQE61 の NcoI および KpnI サイトに連結し、pSPB1617 cDNA の大腸菌発現ベクターである pSPB1642 を得た。同様にして 10 種類の GT cDNA の大腸菌発現ベクターを構築した。

1617BamHINcoI-FW

配列番号24: 5' -ggg gga tcc atg gct agt gag agc caa ata-3

1617XhoIKpnI-RW

配列番号25: 5' -ccc ctc gag ggt acc tca caa aac att att ca
c gac-3'

各発現ベクターを大腸菌株 JM109 (TOY0B0)に導入し、37℃で終濃度20ug/mlのアンピシリンを含むLB培地で一晩前培養した。前培養液の1mlをアンピシリン50 μg/ml, カザミノ酸0.5%を含むM9培地、50mlに加えA600=0.6-1.0に達するまで培養した後、IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) を終濃度0.1mMになるよう加え、さらに27℃で一晩振とう培養し、3000rpm,10分間、4℃で遠心し、集菌した。菌体を10mlの緩衝液 (30mM Tris-HCl pH7.5、30mM NaCl) に懸濁し、SONIFIER 250 (BRANSON社) での超音波処理により大腸菌を破碎した後、15,000rpm, 10分、4℃で遠心分離を行い、得られた上清を粗酵素液とし、以下の活性測定に用いた。

3-2 酵素活性の測定

H₂Oで平衡化済みの逆相樹脂、TOYOPEARL HW-40F(TOSOH) 1mlにTHC (500 μg/mlエタノール溶液) をH₂Oで希釈しながら負荷した後、水洗することにより、樹脂に固定された基質THCを得た。この樹脂固定されたTHC 100 μlに3-1で得られた粗酵素液200 μlおよび5mM UDP-glucose 10 μlを加え、30℃で1時間反応させた。遠心して上清を除去後、沈殿した樹脂を水洗し、0.1% TFA (Trifluoroacetic acid)を含む50%アセトニトリル300 μlに懸濁し、超音波処理によりフラボノイドを樹脂より遊離した。15,000 rpm、5分、4℃で遠心分離し、得られた上清をフィルター (ポアサイズ0.45mm、4 mm Millex-LH、ミリポア) を用いて不溶物を除去して、上清を液体高速クロマトグラフィー (以下HPLC) で分析した。カルコンおよびその配糖

体の分析条件は以下の通りである。

カラムはDevelosil C-30-UG-5(4.5mmφ x150mm、野村化学)を用いて、移動相にはA液として0.1% TFAを含むH₂O、B液として0.1% TFAを含む90%アセトニトリルを用い、B液20%からB液70%の直線濃度勾配10分間の溶出後、B液70%で5分間維持した。流速は0.6ml/min.、検出は360 nmにおける吸光度、及びPDA検出器SPD-M6A（島津製作所）による250-400nmの吸収スペクトルにより行った。この条件で、THCは保持時間10.7分に溶出され、その2' 位配糖体および4' 位配糖体は8.5分に溶出されることをTHC及びTHCの2' 位および4' 位配糖体の標品を用いて確認した。

pSPB1642を発現する大腸菌の抽出液を反応させたところ、基質THCに加え、8.5分に溶出される新たな生成物が検出された。これらはpQE61 ベクターのみを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液およびpSPB1642を発現する大腸菌の粗酵素液を煮沸した溶液を反応させたものでは検出されなかったことからpSPB1642から発現されるGTによって生じた生成物と考えられる。さらに¹H NMR分析によって本生成物の構造を調べた。分析にはJNM-EX400 (JEOL) を用い、その他の分析条件は論文 (Plant Physiology 132、1652(2003)) に記載のとおりである。この結果、pSPB1642の発現産物によって生じたTHC配糖体はTHC2' 位配糖体であることが明らかとなった。よって、pSPB1642によって発現されるcDNA、つまりpSPB1617cDNAは2' CGT活性を有するタンパク質をコードしていると考えられた。

実施例 4. 4' CGT遺伝子のスクリーニング 2

黄色キンギョソウ花卉のcDNAライブラリー約30万クローンをpSPB1617cDNA全長をプローブとして再度スクリーニングした。PCRによるプローブラベリングには、1617-F（配列番号：26）ならびに1617-R（配列番号：27）プライマーを用い、実施例2記載の方法

と同様に行った。スクリーニングと塩基配列の解析方法も実施例 2 と同様である。

1617-F

配列番号 26 : 5' -ATG GGA GAA GAA TAC AAG AAA ACA-3'

1617-R

配列番号 27 : 5' -TAA AAT TTG GTA GTT AAA CCG ATG TA-3'

その結果、新規 GT 遺伝子を 5 種、pSPB1721、1724、1723、1719、1725 を得た。それぞれの配列を配列表に示した（配列番号：28～31 及び 1）。

このうち p SPB1725 c DNA は、457 アミノ酸からなる分子量 50.8 kDa、等電点 6.82 のタンパク質をコードする 1374 bp（ストップコドンを除く）の翻訳領域を含んでいた。p SPB1725 c DNA がコードするアミノ酸配列（配列番号：2）を、すでに報告のある GT のアミノ酸配列と比較したところリビングストーンデージー由来 G T（Plant J. 19、509（1999））と 14%、シソ由来 5 G T と 18%、シソ由来 3 G T と 18%、リンドウの 3' GT と 23%、プローブとして用いた p SPB1617 にコードされるタンパク質のアミノ酸配列とは 31% の同一性しか示さなかった。なお、ホモロジー解析に使用したソフトウェアは MacVector ver. 6.5.3（Oxford Molecule）に含まれる ClustalW で、条件は、Matrix Blosum 30、ketuple:1、Gap penalty:3、Topdiagonals : 5、Windows Size:5 で行った。

実施例 5. 得られた cDNA の大腸菌における発現

5-1. 発現ベクターの構築

実施例 4 で得られた 5 種類の cDNA について、大腸菌発現系を用い各 cDNA にコードされるタンパク質の酵素活性の測定を調べた。発現ベクターの構築ならびに発現方法、活性測定方法は実施例 3 と同様である。例えば p SPB1725 については、開始コドンの 5' 側に NcoI

認識配列を導入するために、以下に示すプライマー2種1725-NcoI（配列番号：32）、1725-KpnI（配列番号：33）を用いてPCR反応を行った。

1725-NcoI

配列番号32：5'-CCC ATG GGA GAA GAA TAC AAG AAA-3'

1725-KpnI

配列番号33：5'-GGT ACC TAT AAA ATT TGG TAG TTA AA-3'

PCR液（25 μ l）は、p SP1725 DNA 10ng, 1x ExTaq buffer（Takara）、0.2mM dNTPs, 1725-NcoI、1725-KpnIプライマー各0.2 pmol/ μ l, ExTaq polymerase 1.25 Uからなる。

反応は、94℃で5分反応させた後、94℃、1分、55℃、1分、72℃、2分の反応を28サイクル行い、最後に72℃で7分間処理した。得られたPCR産物をpCR2.1 TOP0 vector（INVITROGEN）に製造者が推奨する方法でサブクローニングした。増幅産物の塩基配列を確認したのち、NcoIおよびKpnI処理によってpCR2.1 TOP0 vectorから切り出される約1.4Kbのフラグメントを pQE61（QIAGEN）のNcoIとKpnIサイトに連結し、大腸菌発現ベクター p SPB1768を得た。これを大腸菌 JM109 株（TOYOBO）に導入した。他の4種類の cDNAについても同様にそれぞれpQE61を用いた大腸菌発現ベクターを構築し、JM109に導入した。

5-2 組換えタンパク質の大腸菌における発現とGT活性測定

実施例5-1で得られた大腸菌形質転換株を、実施例3と同様の条件で培養し、それぞれのcDNAにコードされるタンパク質の活性測定を行った。その結果、p SPB1768を含む大腸菌の粗酵素液とTHCの反応物中に、THC配糖体と思われるピークを検出した。このTHC配糖体をさらに詳しく同定するために、以下に記載のTHC2' 位配糖体とTHC4' 位配糖体を分離する条件にて再度HPLC分析を行った。

カラムはYMC-ODS-A312(6mmφ x150mm、株式会社ワイエムシー)を用いて、移動相にはA液として2%酢酸を含むH₂O、B液としてメタノールを用い、B液15%からB液40%の直線濃度勾配15分間の溶出後、B液40%で5分間維持し、さらにB液40%からB液62%の直線濃度勾配10分間の溶出の後、B液62%で2分間維持した。流速は1.0 ml/min.で行った。検出は360 nmにおける吸光度、及びPDA検出器SPD-M6A（島津製作所）による250-400nmの吸収スペクトルにより行った。

この条件で、THCは保持時間26.7分に溶出され、THC2' 位配糖体は19.8分、THC 4' 位配糖体は20.6分に溶出される。pSPB1768を発現する大腸菌抽出液とTHCの反応液中に見出されたTHC配糖体は本条件による分析で20.6分に溶出されたのでTHC 4' 位配糖体であると考えられた。これはpQE61 ベクターのみを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液を反応させたものでは検出されなかったことから p SPB1725にコードされるGTによって生じた産物と考えられる。以上の結果から、p SPB1725 c DNAにコードされるGTはTHCの4' 位の水酸基にグルコースを転移する活性を有することが確認された。

また、本反応液中にはTHC4' 位配糖体に加えて15.5分に溶出される新たなピークが検出された。この物質はナリングニンの吸収スペクトルを示し、ナリングニン7 位配糖体標品と保持時間が一致した。よってこの15.5分に溶出された生成物はpSPB1725にコードされる4' CGTによって生成したTHC 4' 位配糖体が、配糖化後に閉環して生じたナリングニン7位配糖体あるいはTHCが閉環して生じたナリングニンに、4' CGTが作用して生じたナリングニン7位配糖体と考えられる。

実施例 6. キンギョソウ花卉における4' CGT遺伝子の発現解析

RT-PCR法によってpSPB1725にコードされる4' CGT遺伝子の黄色キンギョソウ花卉における発現様式を解析した。オーロン類を蓄積す

る黄色キンギョソウ（バタフライイエロー品種）の花弁を成長段階に沿って5ステージに分離した。若い順に、ステージ1(蕾花弁長1cm以下), 2(蕾花弁長1.0-1.5cm), 3(蕾花弁長1.5-2.0cm), 4(花弁長2.0-2.5cm、開花直前)および5(花弁長2.5cm以上、開花後の花弁)の5段階とし、ステージ5は成熟した花弁に対応する。

分離した花弁から1gからRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてRNAを抽出した。得られたRNA 1 μ gを鋳型として逆転写反応を行い、cDNAを得た。cDNA合成にはSuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR(GIBCO BRL)を利用し、合成条件は本システム製造業者が推奨する条件に従った。得られたステージ別のcDNAを鋳型に、実施例5に記載の1725-Nco1(配列番号: 32) および1725-Kpn1プライマー(配列番号: 33) を用いてPCRを行った。また、4' CGT遺伝子発現量と内在遺伝子発現量とを比較するために、内部標準遺伝子としてキンギョソウのグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)遺伝子(配列番号: 34) を用い(Nature 339, 46 (1989))、本遺伝子増幅のためにAmGAPDH-F(配列番号: 35)、AmGAPDH-R(配列番号: 36) のプライマーを合成した。また、比較対象遺伝子としてキンギョソウのAS遺伝子増幅のためにAmAS-F(配列番号: 37)、AmAS-Rプライマー(配列番号: 38) を合成した。

AmGAPDH-F

配列番号35: 5' -tgt tgc tgt taa cga tcc at-3'

AmGAPDH-R

配列番号36: 5' -agc tct tcc acc tct cca-3'

AmAS-F

配列番号37: 5' -atg ttc aaa aat cct aat atc cgc-3'

AmAS-R

配列番号38: 5' -tta gcc atc aag ctc aat ctt gac a-3'

PCR条件は実施例3と同様の反応組成で、94℃、1分、55℃、1分、72℃、2分を12サイクル行った。PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動で分離した後、常法によってHybond-Nナイロンメンブレン(アマシャム)にブロッティングし、ハイブリダイゼーションによる増幅産物の検出を行った。ハイブリダイゼーション方法については前述のノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システムDIG DNA標識及び検出キットを用い、製造者の推奨する方法に従った。プローブには、キンギョソウのAS、GAPDHおよびpSPB1725にコードされる4' CGTのcDNAを用い、実施例2同様にして、上記の各遺伝子特異的プライマー（配列番号32, 33, 35～38）を用いてDIGラベリングを行った。

その結果、4' CGT遺伝子及びAS遺伝子はともにステージ4で発現がピークに達し、経時的に同様の発現パターンを示すことが分かった。さらに両遺伝子の発現パターンは黄色キンギョソウ花卉に含まれるカルコン4' 位配糖体およびオーロン類の蓄積パターンに矛盾しないと考えられた (Plant Sci. 160, 229 (2001))。

以上の結果からpSPB1725にコードされる4' CGT遺伝子は、キンギョソウ花卉内においてAS遺伝子と同一の発現制御支配下に存在することが考えられ、両者は同一の生合成経路、すなわちオーロン類の生合成経路に関わっていると考えられる。

実施例7 植物における4' CGTとASの共発現

7-1 4' CGT発現カセットの構築

pBE2113-GUS (Plant Cell Physiol. 37, 45 (1996)) をSnaBIで消化し、再連結することによりomega配列を除き、得られたプラスミドをpUE6とした。一方、pUCAP (van Engelen et al. Transgenic Research 4, 288-290, 1995)をAscIで消化し、平滑末端化後、Pac Iリンカーを挿入したプラスミドをpUCPPとした。pUE6のE1₂35Sプロ

モーターからNOSターミネーターまでを有する断片を、pUCPPのHind IIIとEcoRIサイトに挿入しpSPB540を得た。pSPB540のGUS遺伝子部分をpSPB1725から切り出される4' CGT cDNA断片に置換し得られたプラスミドをpSFL203とした。すなわち、pSFL203はpUCPPをベクターとし、E1₂35SプロモーターとNOSターミネーターで制御される4' CGT発現カセットを有するものである。

7-2 AS発現カセットの構築

キンギョソウ由来のAS cDNA (Science 290, 1163, (2000))がpBluescript II SK-ベクター(Stratagene)のEcoRIとXhoIサイトに挿入したプラスミドをpSPB251とした。pBINPLUS (van Engelen et al. Transgenic Research 4, 288-290, 1995)にMacIプロモーター、pSPB251から切り出したAS cDNA断片、MASターミネーターを連結したAS発現コンストラクトをpSPB1624とした。

7-3 4' CGTとASの共発現コンストラクトの作製

7-1に記載のpSFL203をPacIで切断し、カルコン配糖化酵素遺伝子発現カセットを切り出し、これを7-2記載のpSPB1624のPacIサイトに挿入した。得られたコンストラクトをpSFL201とした。よってpSFL201は植物細胞に導入された場合、4' CGT遺伝子とAS遺伝子が構成的に発現するように設計されている。

実施例8 植物における4' CGTとASの共発現ならびにトレニアのDFRの抑制

8-1トレニア由来のDFR遺伝子発現抑制カセットの構築

トレニアのジヒドロフラボノール還元酵素 (DFR) cDNAについては論文(Plant Science 153, 33,2000)に記載のようにして取得した。トレニアDFR cDNAがベクターpBluescriptII SK-と連結したプラスミドをpTDF10とした。これを鋳型とし、ベクター配列に由来するM13リバープライマー (配列番号39) とトレニアDFR cDNA配列に

塩基置換でNcoI認識部位を導入したプライマーThDFR-NcoI(配列番号40)を用いて、実施例3に記載のようにしてPCRを行った。得られた約0.75kbのフラグメントをpCR2.1-TOP0 (インビトロジェン) にクローニングし、塩基配列を確認したのち、SacIとNcoIで0.75kbのトレニアDFR cDNA配列を切り出した。

またpTDF10をBamHIとNcoIで切断し、トレニアDFR cDNAの5'末端から1.1kbを含むフラグメントを回収した。一方、7-1記載のpUCAPをPacIで消化し、平滑末端化後、AscIリンカーを挿入したプラスミドをpUCAAとした。このpUCAAのHindIIIとEcoRIサイトに、pUE6から切り出したE1₂35Sプロモーター～GUS～NOSターミネーターに至るフラグメントを挿入し、得られたプラスミドをpSPB541とした。pSPB541をBamHIとSacIで切断し、GUS遺伝子部分を除き、ここに、トレニアDFR cDNA由来の0.75kbのフラグメントとおよび1.1kbのフラグメントを、両フラグメントのNcoI部位が連結する方向に挿入した。このようにして得られたプラスミドpSFL314は、植物体内の導入された場合、E1₂35Sプロモーターの制御下、トレニアのDFR cDNA配列に由来する二本鎖RNAを転写し、RNAi法によってトレニアのDFR遺伝子発現を抑制することができるものである。

M13リバープライマー

配列番号39: 5' -AACAGCTATGACCATG-3'

ThDFR-NcoI

配列番号40: 5' -GCTTTACCATGGAGTAATGAGCTT-3'

8-2 4' CGTとASの共発現ならびにトレニアのDFR遺伝子発現の抑制のためのコンストラクトの構築

7-1記載のpUE6のNOSターミネーター上流にXhoIリンカーを挿入した。このプラスミドをBamHIとXhoIで消化して得られるE1₂35Sプロモーター～ベクター～NOSターミネーターからなる断片と7-2記載の

pSPB215からBamHIとXhoIで切り出したAS cDNA断片を連結しpSPB211を得た。pSPB211からHindIIIとEcoRIでAS発現カセットを切り出し、これをpBINPLUSのHindIIIとEcoRIサイトに挿入した。このようにして得られたプラスミドのPacIサイトに、7-1記載のpSFL203をPacI切断して得られる4' CGT発現カセットを挿入し、4' CGTとASの発現カセットがタンデムに連結したpSFL304を得た。さらに8-1記載のトレニアDFR 二本鎖RNA転写カセットをpSFL304のAscIサイトに挿入し、pSFL307を得た。つまりpSFL307は4' CGTとASの発現ならびにトレニアのDFR遺伝子発現抑制のための3つのカセットを有する。

実施例9 植物における4' CGTとASの共発現ならびにトレニアのF3H遺伝子発現の抑制

9-1トレニア由来のF3H cDNAのクローニングと同遺伝子発現抑制カセットの構築

シソから得られたF3H cDNA (Plant Mol Biol., 35, 915 (1997)) をプローブとして、トレニアの同酵素をコードするcDNAを取得した。すなわち、実施例2同様にして、トレニアcDNAライブラリー (Molecular Breeding, 6, 239, 2000) 約20万のファージをスクリーニングした結果、配列番号41に示すトレニアF3H cDNAを得た。トレニアF3H cDNAがベクターpBluescriptII SK-と連結したプラスミドをpSPB266とした。これを鋳型とし、ベクター配列に由来するM13リバースプライマー (配列番号39) とトレニアF3H cDNA配列に塩基置換でSalI認識部位を挿入したプライマーThF3H-SalI-1(配列番号42)を用いて、実施例3同様にしてPCRを行った。

得られた約0.9kbのフラグメントをpCR2.1-TOP0 (インビトロジェン) にクローニングし、塩基配列を確認した。同様にして、トレニアF3H cDNA配列に塩基置換でSalI認識部位を挿入したプライマーThF3H-SalI-2(配列番号43)とM13リバースプライマーを用いて、約0.

75kbのDNA断片を調整し、pCR2.1-TOP0にクローニングし、塩基配列を確認した。実施例8-1に記載のpSPB541をBamHIとSacIで切断し、GUS遺伝子部分を除き、ここにpCR2.1-TOP0からBamHIとSalI切断で切り出した0.9kbのフラグメントと、pCR2.1-TOP0からSacIとSalI切断で切り出した0.7kbのフラグメントを両フラグメントのSalI部位が連結するように挿入した。このようにして得られたプラスミドpSFL313は、植物体内に導入された場合、E1₂35Sプロモーターの制御下、トレニアのF3H cDNA配列に由来する二本鎖RNAを転写し、RNAi法によってトレニアのF3H遺伝子発現を抑制するものである。

ThF3H-SalI-1

配列番号42: 5' -ttctctgtcgacgccccattgcc-3'

ThF3H-SalI-2

配列番号43: 5' -cgccgtgtcgactcgcttgaag-3'

9-2 4' CGTとASの共発現ならびにトレニアのF3H遺伝子発現の抑制のためのコンストラクトの構築

9-1記載のpSFL313からAscI切断によりトレニアF3H RNAiカセットを切り出し、実施例8-2記載のpSFL304のAscIサイトに挿入し、pSFL308を得た。つまりpSFL308は4' CGTとASの発現ならびにトレニアのF3H遺伝子発現抑制のための3つのカセットを有する。

実施例10. 植物における遺伝子発現と花色分析

実施例7-9で述べた p SFL201、 p SFL307および p SFL308を公知の方法でトレニア（品種サマーウェーブブルー（サントリーフラワー株式会社））に導入した。形質転換の方法はMol. Breeding. 6, 239, (2000)に記載の方法にしたがった。選択マーカー耐性を示した個体を選抜し、それぞれの花色を観察した。p SFL201導入株では、得られた35系統の形質転換体のうち、22系統において宿主と比べて花色変化が見られ、黄色味を帯びた青、もしくは黄色味を帯びた

グレーを示した。

しかし、完全に黄色になったものはなかった。pSFL307導入株では得られた36系統の形質転換体のうち、19系統において宿主と比べて花色変化が見られた。さらに、花色が変化した19系統のうち6系統については宿主本来の青い色がほとんど混在せず、ほぼ完全な黄色花色を呈していた。また p SFL308導入株では得られた39系統の形質転換体のうち、24系統において宿主と比べて花色変化が見られた。さらに、花色が変化した24系統のうち17系統については宿主本来の青い色がほとんど混在せず、ほぼ完全な黄色花色を呈していた。

花色変化が比較的顕著であったものについて色素分析を行った。

元株および各形質転換体の花卉を0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む50%アセトニトリルに浸潤し、フラボノイドを抽出後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によりオーレウシジン6位配糖体およびアントシアニジンの分析を行った。アントシアニン分析については花卉より抽出したフラボノイドを6N HClに溶解し、沸騰水中に20分間保持することにより加水分解後、アミルアルコールにてフラボノイドを再抽出したものを分析に供した。HPLC条件はそれぞれ以下のとおりである。

まずAU6位配糖体の検出には、SHIM-PACK FC-ODSカラム(50×4.6mm、島津製作所)を用い、移動相にはA液として0.05%TFAを含むH₂O、B液として0.05%TFAを含むアセトニトリルを用いた。B液10%から23%の直線濃度勾配3分間の溶出後、B液23%で17分間維持し、さらにB液23%から80%の直線濃度勾配2分間の溶出後、B液80%で3分間維持した。さらにB液80%から10%の直線濃度勾配2分間で溶出した。流速は0.8ml/minで行った。検出は360、400nmにおける吸光度、およびPDA検出器SPD-M10AVP (島津製作所) による250-500nmの吸収スペクトルにより行った。本条件下で、THC 4' 位配糖体、AU

6位配糖体標品はそれぞれ保持時間14.17分および6.19分に溶出される。

次にアントシアニジンはカラムはYMC-ODS-A A312(6×150mm、株式会社ワイエムシー)を用いた。移動相には酢酸、メタノール、H₂Oをそれぞれ60:70:270に混合したものをを用い、11分間維持した。検出は520nmにおける吸光度、およびPDA検出器SPD-M10AVP(島津製作所)による400-600nmの吸収スペクトルにより行った。本条件下で、マルビジンは保持時間9.12分に溶出される。

その結果、p SFL201を導入した形質転換体ではTHC 4' 位配糖体ならびにAU 6位配糖体と保持時間および吸収スペクトルが一致する生成物が、それぞれ花卉中に0.02%および0.05%(花卉新鮮重量中のW/W)生成していることが確認された。また宿主が本来含有するアントシアニン類も形質転換体に存在するため、これら形質転換体で観察された黄色がかった青またはグレーの花色は、THC 4' 位配糖体ならびにAU 6位配糖体と、マルビジンなどのアントシアニン類が共存したためと考えられる。

一方、p SFL307および308を導入した形質転換体ではオーロンの一種であるAU6位配糖体のみと保持時間および吸収スペクトルが一致する生成物が、ともに花卉中に0.09% (花卉新鮮重量中のW/W)生成していることが確認された。p SFL307またはp SFL308が導入された系統では、宿主が本来有するアントシアニン類が宿主花卉に含まれる当該アントシアニジンの10～50%と著しく減少していることが確認された。

実施例11. ゲノミックサザンハイブリダイゼーションによる4' C GT遺伝子導入の確認

実施例10で得られた形質転換体のうち、花卉の色素分析結果からTHC 4' 位配糖体ならびにAU 6位配糖体の蓄積量が比較的多かった

系統を、各コンストラクト導入株から3系統ずつ選抜し、ゲノミックハイブリダイゼーションをおこなった。形質転換体の葉、約1gからPhytopure Plant DNA Extraction kit(Amersham)を用い、製造業者推奨の方法によってゲノムDNAを抽出した。得られたゲノムDNA各20 μ gを制限酵素KpnIで切断し、0.7% アガロースゲル電気泳動にて分離後、常法にしたがってHybond-N⁺ ナイロンメンブレンに転写後、ノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システムを用い、ハイブリダイゼーションを行った。

4' CGT遺伝子プローブのDIGラベリング、ハイブリダイゼーションならびに検出方法は実施例6同様に製造業者推奨の方法に従った。ハイブリダイゼーションの結果を図2に示す。pSFL201、pSFL307、pSFL308の制限酵素地図を考慮するとゲノミックサザンで検出されたバンドの数から各形質転換体に導入された4' CGT遺伝子コピー数を推定することができる。

pSFL201導入系統については、いずれの系統でも1本のバンドが見られることから1コピーの導入遺伝子を有することが推定される。pSFL307導入系統については、系統番号2および4の個体は1コピー、系統番号13の個体では2本のバンドが見られることから2コピーの4' CGT cDNA が導入されたものと考えられる。pSFL308導入系統については、いずれの系統でも1本のバンドが見られることから1コピーの導入遺伝子を有することが推定される。

実施例12 定量RT-PCRによる導入遺伝子の発現解析

RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて元株および形質転換体各系統のつぼみからtotal RNA を抽出し、得られたtotal RNA 1 μ gよりSuper ScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen)を用いてcDNAを合成した。得られたcDNAのうち1 μ lをテンプレートとし、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System

(Applied Biosystems)にてトレニアDFRとF3Hおよび外来性遺伝子であるASと4' CGTの転写産物の発現定量を行った。製造者が推奨するソフトウェア' Primer Express' にて、各遺伝子の特異的に増幅するようなオリゴプライマーおよび特異的にハイブリダイズするような両末端を蛍光ラベルしたTaq Man プローブを設計し反応に供した。トレニアDFRには、配列番号：54と55のオリゴプライマーおよび配列番号：56のTaq Manプローブを、トレニアF3Hには、配列番号：57と58のオリゴプライマーおよび配列番号：59のTaq Manプローブを、ASには配列番号：60と61のオリゴプライマーおよび配列番号：62のTaq Manプローブを、4' CGTには配列番号：63と64のオリゴプライマーおよび配列番号：65のTaq Manプローブを用いて発現定量を行った。

トレニアDFR

SWB DFR-1158F

5'-AAT GGG ATG CTT CCG ACT TCT-3' (配列番号：54)

SWB DFR-1223R

5'-CAG TGG TTT CTG CCA TTG CTT-3' (配列番号：55)

SWB DFR-1180T

5'-AGG AAA AAA CAG GCT GAA AA-3' (配列番号：56)

トレニアF3H

Torenia F3H-1035F

5'-CAT CGA GCG GTG GTG AAT T-3' (配列番号：57)

Torenia F3H-1101R

5'-CTG GCG ATG GGT TTT GAA A-3' (配列番号：58)

Torenia F3H-1055T

5'-AAA CAC GAA TAG AAT GTC G-3' (配列番号：59)

AS

AmAS-1545F

5'-GAA GAT GAC CTT GCG GTG ATT T-3' (配列番号 : 60)

AmAS-1638R

5'-TTG TCC TCT TCC CCT TTA TAG GTT T-3' (配列番号 : 61)

AmAS-1582T

5'-AGT TCG CCG GGA GTT TCG TGA GTC TG-3' (配列番号 : 62)

4' CGT

AmGTcg12-908F

5'-GGT TGG CCC GCA TTT CA-3' (配列番号 : 63)

AmGTcg12-966R

5'-TAG AAA ACC CTC CGG CAG AA-3' (配列番号 : 64)

AmGTcg12-929T

5'-AGA TGG ACT TAA ATG CG-3' (配列番号 : 65)

また内在性コントロールとして、トレニアのグリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を用いた。オリゴプライマーにはSWB GAPDH-794F (5'-GCA TTG AGC AAG ACG TTT GTG-3') (配列番号 : 66) とSWB GAPDH-859R (5'-ACG GGA ACT GTA ACC CCA TTC-3') (配列番号 : 67) を、Taq ManプローブにはSWB GAPDH-816T (5'-AGC TTG TGT CGT GGT ACG-3') (配列番号 : 68) を用いた。

反応液は、元株または形質転換体各系統のcDNA , 1x Taq Man Universal Master Mix (Applied Biosystems),オリゴプライマー 各100nM, Taq Manプローブ 100nMからなる 総体積50 μ l に調整した。反応条件は、50℃で2分、95℃、10分反応させた後、95℃、15秒、60℃、1分の反応を40サイクル行いPCRでの増幅産物の生成過程をリアルタイムで検出した。その結果、pSFL201導入系統では導入したAS, 4' CGTがともに高発現していることを確認した。pSFL307導入系統では導入したAS, 4' CGTがともに発現し、内在性のDFRmRNAが元

株に比べて約10%程度にまで抑制されていることが確認された。また、pSFL308導入系統においては導入したAS, 4' CGTがともに発現し、内在性のF3HmRNAが元株に比べて約5%程度にまで抑制されていることが確認された。

実施例13 4 'CGTのPHCに対する配糖化活性の測定

黄色キンギョソウ花卉内においてPHC4' 位配糖体が確認されており (Sato, T., et al. Plant Sci. 160, 229-236 (2001))、ASがこれらPHCおよびPHC4' 位配糖体を基質としてブラクテアチンおよびブラクテアチン6位配糖体を生成できることが知られている。4' CGTがPHCの4' 位の配糖化反応を触媒できるかどうかを明らかにするために、4' CGTのPHCに対する配糖化活性を測定した。実施例5-2にしたがって、大腸菌で発現した組換え4' CGTを用いて実施例3-2と同様の方法で樹脂に固定したPHCを基質として、酵素反応を行った。HPLC分析条件は以下の通りである。

カラムはYMC-ODS-A312(6mm ϕ x150mm、株式会社ワイエムシー)を用いて、移動相にはA液として2%酢酸を含むH₂O、B液としてメタノールを用い、B液15%からB液40%の直線濃度勾配22分間の溶出後、B液40%で5分間維持し、さらにB液40%からB液62%の直線濃度勾配で14分間溶出後、B液62%で2分間維持した。流速は1.0 ml/分で行った。検出は360 nmにおける吸光度、及びPDA検出器SPD-M10AP (島津製作所) による220-400nmの吸収スペクトルを測定することにより行った。この条件で、THCは保持時間38.2分に溶出され、THC2' 位配糖体は27.7分、THC 4' 位配糖体は30.0分、PHCは32.4分、PHC4' 位配糖体は24.3分に溶出される。pSPB1768を発現する大腸菌抽出液とPHCの反応液中に見出されたPHC配糖体は、本条件による分析で24.3分に溶出されたので、PHC 4' 位配糖体であると同定した。pQE61ベクターのみを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液とPH

Cを反応させた場合には、PHC配糖体は検出されなかった。したがって、PHC 4' 位配糖体は p SPB1725にコードされるGTによって生じた産物であると考えられる。以上の結果から、p SPB1725 cDNAにコードされるGTはPHCの4' 位の水酸基にグルコースを配糖化する活性を有することが確認された。以上の結果から、4' CGTはTHCの4' 位の配糖化のみならずPHCの4' 位の配糖化反応を触媒することが示された。

実施例14 形質転換トレニアを用いた4' CGTおよびASの機能解析

14-1 コンストラクトの構築

実施例7に記載の p SFL203からPacIで2.4kbの4' CGTの発現カセット部分を切り出し、これをpBINPLUSのPacIサイトに導入したものをpSFL209とした。pSFL209は植物体内において4' CGTを単独で発現させるものである。

実施例9に記載の p SFL313からAscIで2.7kbのF3H発現抑制用カセットを切り出し、これをpBINPLUSのAscIサイトに導入したものをpSFL210とした。pSFL210は、トレニア植物体内においてトレニアのF3H遺伝子の2本鎖RNAを転写させることにより、F3Hの発現を抑制することを意図したものである。

一方、ASについては、特許出願（P 2 0 0 3 - 2 9 3 1 2 1）にある p SPB120' のBamHIとXhoIサイトに、実施例7に記載のpSPB251からBamHIとXhoIで切り出したAS cDNA断片を挿入することによって、植物体内でASを発現するベクター p SPB211を得た。

14-2 RT-PCRによる導入遺伝子の発現解析と花色分析

実施例14-1で述べた p SFL209、p SFL210および p SPB211を実施例10に記載の方法でトレニア（品種サマーウェーブブルー（サントリーフラワーズ株式会社））に導入した。形質転換の方法はMol. Breeding. 6, 239, 2000に記載の方法にしたがった。選択マーカー耐

性を示した個体を選抜した。得られた形質転換体および元株サマールウェブルー各系統のつぼみからRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてtotal RNA を抽出し、得られたtotal RNA 1 μ gよりSuper ScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen)を用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。さらにEx Taq (Takara) を用いて製造者の推奨する方法によりRT-PCR反応を実施した。ASのmRNAの増幅にはプライマーAmAS-INSITU-FW(5' -aattatttc ccaatgttcaaaaat-3') (配列番号44) とAmAS-INSITU-RV(5' -tggag ctttaggtttgtgaaa-3') (配列番号45) を、キンギョソウ4' CGTのmRNAの増幅にはプライマーKIR-INSITU-FW(5' -atgggagaagaatacaag aaaac-3') (配列番号46) とKIR-INSITU-RV (5' -tccttacgataaaac aaactca-3') (配列番号47) を、内在性F3HのmRNAの増幅にはプライマーT.F3H-923F(5' -ATC ATC GAG CGG TGG TGA A-3') (配列番号48) とT.F3H-1339R (5' -TGG CCG ACT AGG CAA TAC AAT-3') (配列番号49) を、さらに内部標準遺伝子としたGAPDHのmRNAの増幅にはプライマーT.GAPDH-F87(5' -CCC TTC TGT TTG GTG AAA AGC C-3') (配列番号50) とT.GAPDH-R692(5' -CCT CGG ATT CCT CCT TG A TAG C-3') (配列番号51) を用いた。その結果、pSFL209導入系統では取得した形質転換体41系統のうち、導入したキンギョソウ4' CGT転写物が検出できたのは37系統であったが、いずれの系統においても花色変化は認められなかった。pSFL210導入系統では取得した形質転換体44系統のうち内在性F3' Hの転写物の量が有為に減少していることを検出できたのは37系統であり、これらの系統は白色あるいは紫と白色の混色の花色を示した。さらに、pSPB211導入系統では取得した形質転換体41系統のうち導入したASが発現していることを確認できたのは31系統であり、いずれの系統においても花色変化は認められなかった。

pSFL209導入系統およびpSPB211導入系統は導入した遺伝子の転写産物が検出できた系統について、pSFL210導入系統は花色が白色を示した系統について色素分析を行った。サマーウェブブルーおよび各形質転換体の花卉を0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）を含む50%アセトニトリルに浸潤し、フラボノイドを抽出後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によりAU6位配糖体およびアントシアニジンの分析を行った。アントシアニン分析は実施例10に記載のように行った。HPLC条件はそれぞれ以下のとおりである。

まずAU6位配糖体の検出には、Shim-Pack FC-ODSカラム（50×4.6mm、島津製作所）を用い、移動相にはA液として0.05% TFAを含むH₂O、B液として0.05% TFAを含むアセトニトリルを用いた。B液10%から23%の直線濃度勾配3分間の溶出後、B液23%で17分間維持し、さらにB液23%から80%の直線濃度勾配2分間の溶出後、B液80%で3分間維持した。さらにB液80%から10%の直線濃度勾配2分間で溶出した。流速は0.8ml/分で行った。検出は、360及び400nmにおける吸光度、およびPDA検出器SPD-M10AVP（島津製作所）による250-500nmの吸収スペクトルの測定により行った。本条件下で、THC 4' 配糖体、AU6位配糖体標品はそれぞれ保持時間14.17分および6.19分に溶出される。次にアントシアニジンはカラムはYMC-ODS-A A312（6×150mm、株式会社ワイエムシー）を用いた。移動相には酢酸、メタノール、H₂Oをそれぞれ60:70:270に混合したものを用い、11分間維持した。検出は520nmにおける吸光度、およびPDA検出器SPD-M10AVP（島津製作所）による400-600nmの吸収スペクトルの測定により行った。本条件下で、マルビジンは保持時間9.12分に溶出される。

その結果、pSFL209導入系統ではTHC 4' 位配糖体と保持時間および吸収スペクトルが一致する生成物が、新鮮花卉重量1gあたり0.036～0.762mg生成していることが確認された。また宿主が本来含有

するアントシアニン類も存在した。

p SFL210導入系統ではアントシアニン量は、宿主花卉に含アントシアニン量の約1%程度に減少していることがわかった。

またpSPB211導入系統では、宿主と比較してフラボノイド色素に変化は認められなかった。いずれの形質転換体においてもオーロン類と保持時間および吸収スペクトルが一致する生成物は検出されなかった。

したがって、F3Hの発現抑制ならびにASの過剰発現だけではカルコン配糖体あるいはオーロンは植物体内で合成されないこと、4' CGTとASの共発現によりオーロンが合成されることが示された。4' CGT単独の過剰発現により、カルコン4' 位配糖体を蓄積させることができ、花色の変化に役立つことがわかった。

実施例15 リナリアからの4' CGT c DNAのクローニング

実施例1と同様にして、リナリア (*Linaria bipartita*) の蕾及び開花した花の花びらから抽出したRNAを用い、c DNAライブラリーを作製した。蕾由来のRNAから 8.0×10^5 pfu/mlのライブラリーが得られ、一方、開花花卉のc DNAを用いたものからは 1.0×10^6 pfu/mlのc DNAライブラリーが得られた。

これら各ライブラリーの約 3.0×10^5 pfuのファージ、実施例4に記載のキンギョソウのp SPB1725にコードされる4' CGT c DNAをプローブとしてスクリーニングを行った。プローブの標識、ハイブリダイゼーションとその後のメンブレンの洗浄、検出方法は実施例2と同様に行った。その結果、最終的に19個の陽性クローンが得られた。これらのうちカルコン糖転移酵素をコードするcDNAとして期待される長さ（約1.5kb）の8個のc DNAについて塩基配列を決定したところ、これら8クローンは全て同じ配列を有しており、最長のc DNAを有するクローンをpSFL409とした。このcDNAの塩基配列を配列番号

: 69に示し、それによりコードされるアミノ酸配列を配列番号: 70に示す。pSFL409のcDNAにコードされるアミノ酸配列はキンギョソウのカルコン4'位糖転移酵素のものと高いホモロジーを有することが明らかとなった。しかし、キンギョソウのカルコン4'位糖転移酵素cDNAと比較すると、pSFL409cDNAにコードされるアミノ酸配列は開始メチオニンから10bp程度を欠く不完全長cDNAであった。そこで、Gene Racer RACE キット (Invitrogen社) を用い、5' RACE 法にて推定開始メチオニンを含む上流のcDNAフラグメントを増幅し、これをpCRII-TOP0ベクターにクローニングしたものをpSFL417とした。この完全長を含むリナリアcDNAはキンギョソウ4'位糖転移酵素とアミノ酸レベルで65%配列同一性を示した。

実施例16 リナリアのcDNAの大腸菌における発現と活性測定

大腸菌発現ベクター pQE61のNcoIサイトとKpnIサイトへ完全長のリナリアcDNAを導入し、大腸菌発現系によって本リナリアcDNAにコードされるタンパク質の活性について解析した。まず、大腸菌発現コンストラクト作製のため、pSFL417を鋳型とし、417-NcoIプライマー (CCCATATATAGCCATGGAAGATACCATCG) (配列番号52) と409-EcoRI (TAGTGTTGTGGAGTCGGGGGATTTTCG) (配列番号53) を用いPCRを行った。これにより、pSFL417の開始メチオニンの位置にNcoIサイトが挿入され、3'側にEcoRIサイトが挿入された。これをNcoI/EcoRIで切断したものとpSFL409cDNAをEcoRI/KpnIで切断したものを、大腸菌発現ベクター pQE61のNcoI/KpnIサイトにクローニングし、完全長リナリアcDNAを有する大腸菌発現用コンストラクト (pSFL418) が得られた。

これを大腸菌JM109に導入し、実施例12と同様にして組換えタンパク質の活性測定を行った。基質にTHCを用い、pSFL418を有する大腸菌抽出液を反応させた場合は保持時間30.0分にTHCの4'位配糖

体が検出された。一方、対照実験として、pQE61ベクターを有する大腸菌抽出液をTHCに反応させた場合は、THCの4' 位配糖体は全く検出されなかった。さらに実施例12にしたがって、PHCに対する配糖化活性を測定した。その結果、pSFL418を有する大腸菌抽出液を反応させた場合には保持時間24.3分にPHC4' 位配糖体が検出された。一方対照実験ではPHC配糖体は検出されなかった。以上の結果から、SFL418にクローニングされたリナリアのcDNAは4' CGTをコードするものと考えられる。

請 求 の 範 囲

1. カルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

2. 配列番号2又は70に記載のアミノ酸配列を有する請求項1記載の遺伝子。

3. 配列番号1又は69に記載する塩基配列の一部または全部に対して、5 x SSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする請求項1記載の遺伝子。

4. 配列番号2又は70に記載のアミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換によって修飾されているアミノ酸配列を有し、カルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする請求項1に記載の遺伝子。

5. 配列番号1又は69に記載する塩基配列の一部または全部からなるDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする請求項1記載の遺伝子。

6. ゴマノハグサ科由来である請求項1～5のいずれか1項に記載の遺伝子。

7. キンギョソウ又はリナリア由来である、請求項6に記載の遺伝子。

8. 請求項1～7のいずれか1項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。

9. 請求項8に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

10. 請求項1～7のいずれか1項に記載の遺伝子によってコー

ドされるタンパク質。

11. 請求項9に記載の宿主細胞を培養し又は生育させ、当該宿主細胞からカルコン類の4'位に糖を転移する活性を有するタンパク質を採取することを特徴とする該タンパク質の製造方法。

12. 請求項1～7のいずれか1項に記載の遺伝子が導入された植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体、栄養増殖した植物、またはそれら植物体の組織。

13. 請求項12に記載の植物体の切り花。

14. 請求項1～7のいずれか1項に記載の遺伝子を用いてカルコン類の4'位に糖を転移する方法。

15. 請求項1～7のいずれか1項に記載の遺伝子を植物体に導入・発現して得られる、花色が改変された当該植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体。

16. 花色が黄色味を帯びていることを特徴とする請求項15に記載の植物体。

17. 請求項1～7のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、花色を黄色く改変させる方法。

18. 請求項1～7のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラボノイド合成系遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法。

19. 請求項1～7のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法。

20. 請求項1～7のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウ

シジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラバノン3-水酸化酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法。

Fig. 1

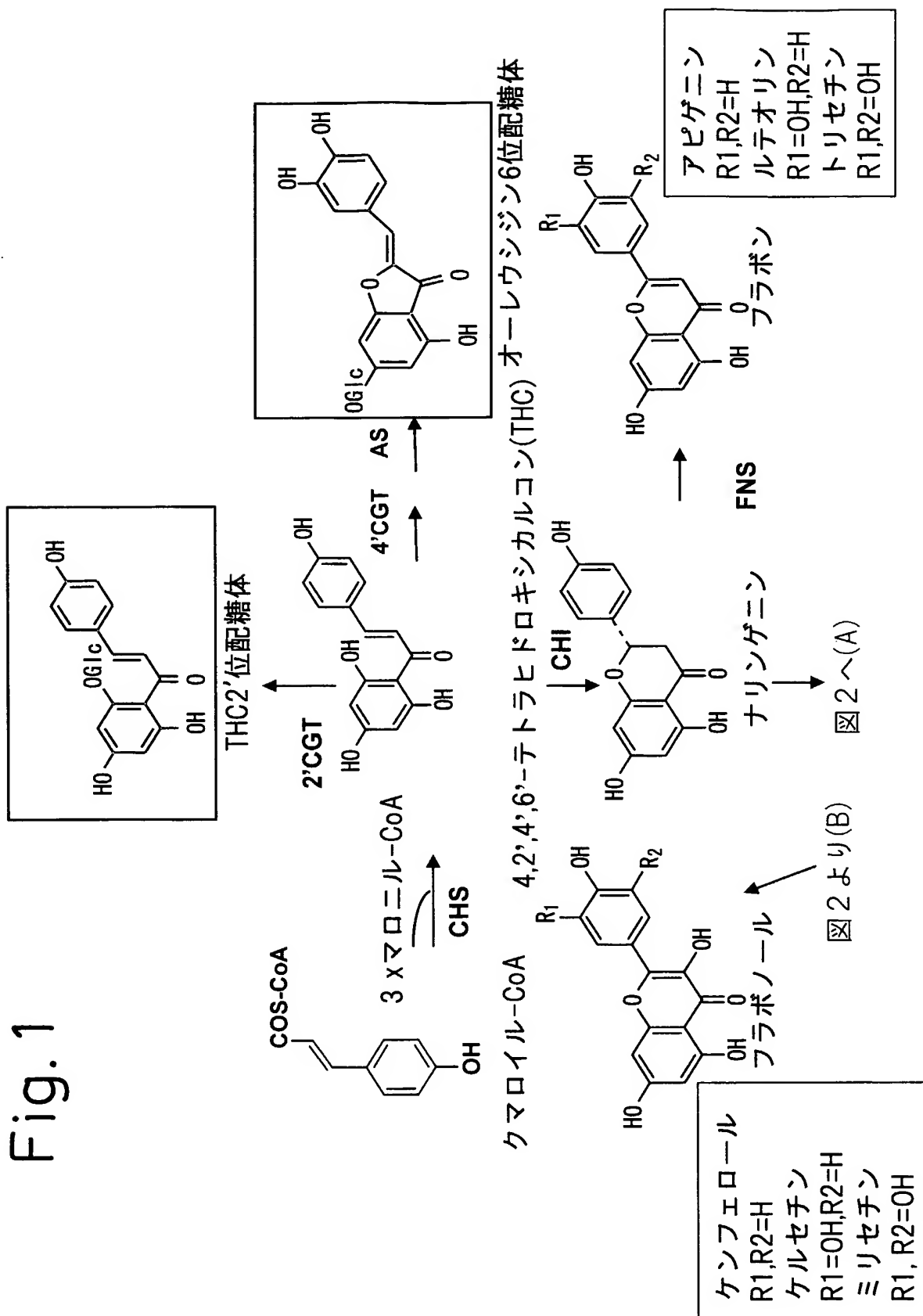


Fig.2

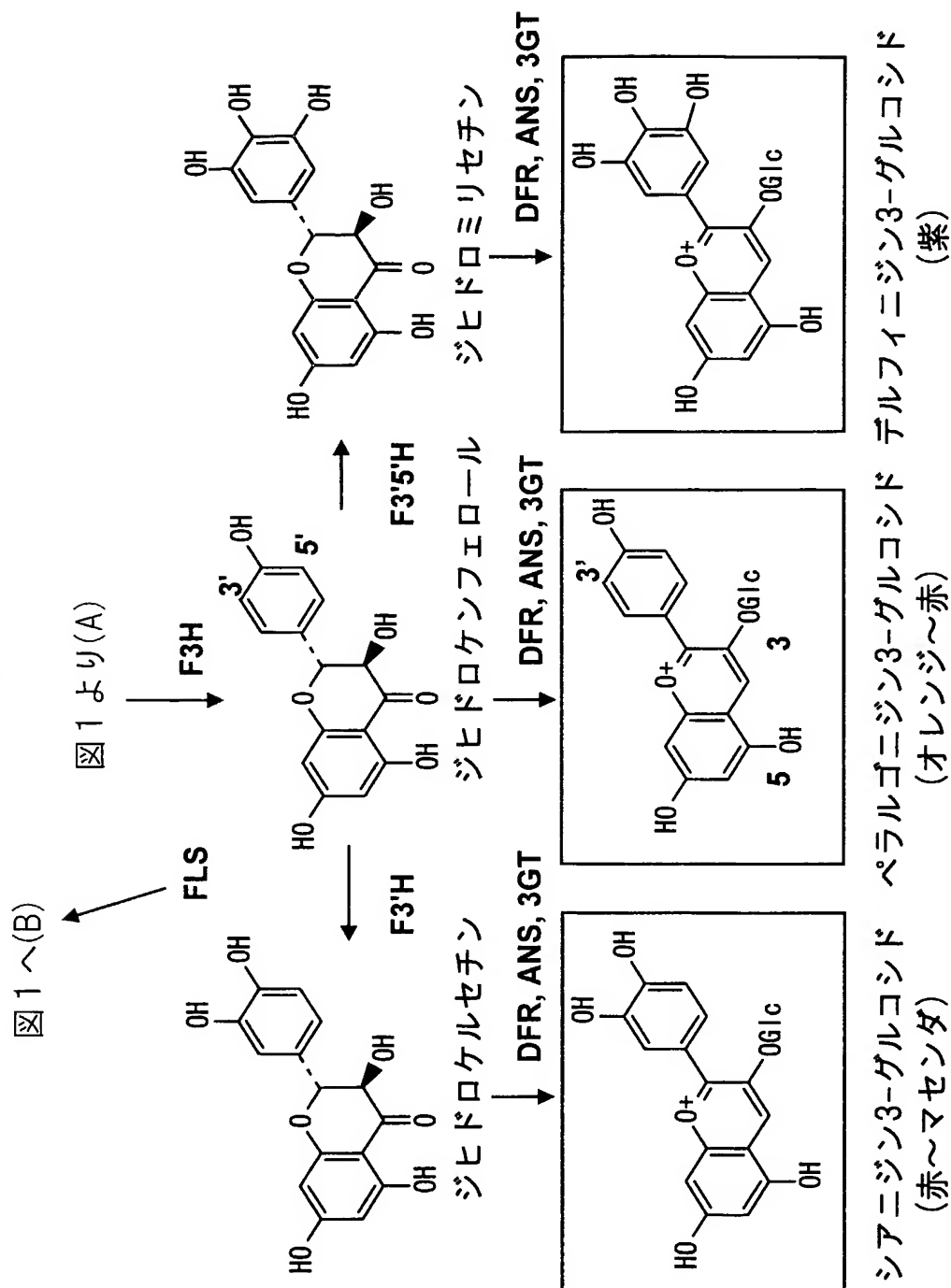
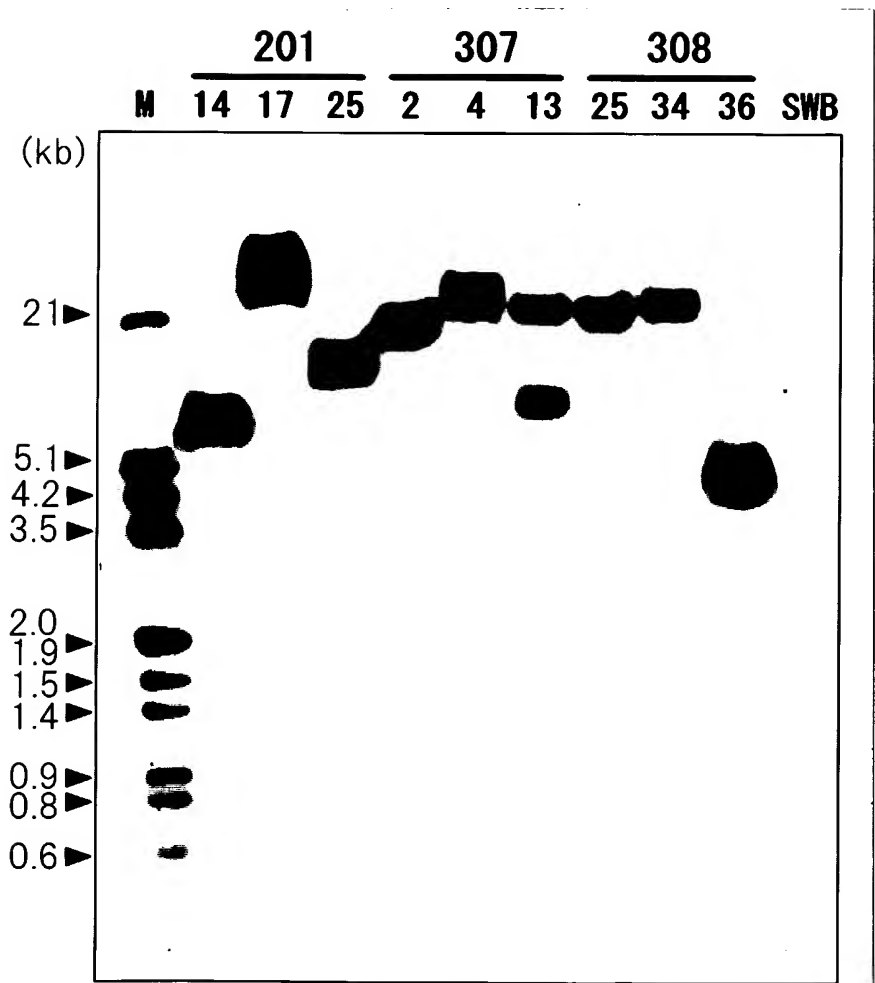


Fig.3



SEQUENCE LISTING

<110>Suntory Limited et al.

<120>Process for production of yellow flowers by control of flavonoid synthesis system

<130>P952

<160>70

<210>1

<211>1422

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>Nucleic acid in pSPB1725

<400>1

atg gga gaa gaa tac aag aaa aca cac aca ata gtc ttt cac act tca	48
Met Gly Glu Glu Tyr Lys Lys Thr His Thr Ile Val Phe His Thr Ser	
1 5 10 15	
gaa gaa cac ctc aac tct tca ata gcc ctt gca aag ttc ata acc aaa	96
Glu Glu His Leu Asn Ser Ser Ile Ala Leu Ala Lys Phe Ile Thr Lys	
20 25 30	
cac cac tct tca atc tcc atc act atc atc agc act gcc ccc gcc gaa	144
His His Ser Ser Ile Ser Ile Thr Ile Ile Ser Thr Ala Pro Ala Glu	
35 40 45	
tct tct gaa gtg gcc aaa att att aat aat ccg tca ata act tac cgc	192
Ser Ser Glu Val Ala Lys Ile Ile Asn Asn Pro Ser Ile Thr Tyr Arg	
50 55 60	
ggc ctc acc gcg gta gcg ctc cct gaa aat ctc acc agt aac att aat	240
Gly Leu Thr Ala Val Ala Leu Pro Glu Asn Leu Thr Ser Asn Ile Asn	
65 70 75 80	
aaa aac ccc gtc gaa ctt ttc ttc gaa atc cct cgt cta caa aac gcc	288
Lys Asn Pro Val Glu Leu Phe Phe Glu Ile Pro Arg Leu Gln Asn Ala	
85 90 95	
aac ctt cga gag gct tta cta gat att tcg cga aaa tcc gat atc aaa	336
Asn Leu Arg Glu Ala Leu Leu Asp Ile Ser Arg Lys Ser Asp Ile Lys	
100 105 110	

gca tta atc atc gat ttc ttc tgc aat gcg gca ttt gaa gta tcc acc	384
Ala Leu Ile Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ala Ala Phe Glu Val Ser Thr	
115 120 125	
agc atg aac ata ccc act tac ttc gac gtc agt ggc ggc gct ttt ctc	432
Ser Met Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Asp Val Ser Gly Gly Ala Phe Leu	
130 135 140	
ctc tgc acg ttt ctc cac cac ccg aca cta cac caa act gtt cgt gga	480
Leu Cys Thr Phe Leu His His Pro Thr Leu His Gln Thr Val Arg Gly	
145 150 155 160	
gac att gcg gat ttg aac gat tct gtt gag atg ccc ggg ttc cca ttg	528
Asp Ile Ala Asp Leu Asn Asp Ser Val Glu Met Pro Gly Phe Pro Leu	
165 170 175	
att cac tcc tct gat tta cca atg agt ttg ttt tat cgt aag act aat	576
Ile His Ser Ser Asp Leu Pro Met Ser Leu Phe Tyr Arg Lys Thr Asn	
180 185 190	
gtt tac aaa cac ttt cta gac act tcc tta aac atg cgc aaa tcg agt	624
Val Tyr Lys His Phe Leu Asp Thr Ser Leu Asn Met Arg Lys Ser Ser	
195 200 205	
ggg ata ctc gtg aac acg ttt gtt gcg ctc gag ttt cga gct aag gaa	672
Gly Ile Leu Val Asn Thr Phe Val Ala Leu Glu Phe Arg Ala Lys Glu	
210 215 220	
gct ttg tcc aac ggt ttg tac ggt cca act ccg cct ctt tat tta ctt	720
Ala Leu Ser Asn Gly Leu Tyr Gly Pro Thr Pro Pro Leu Tyr Leu Leu	
225 230 235 240	
tca cat aca att gcc gaa ccc cac gac act aaa gtg ttg gta aac caa	768
Ser His Thr Ile Ala Glu Pro His Asp Thr Lys Val Leu Val Asn Gln	
245 250 255	
cac gaa tgc cta tca tgg ctt gat ttg cag cct agt aaa agc gtg att	816
His Glu Cys Leu Ser Trp Leu Asp Leu Gln Pro Ser Lys Ser Val Ile	
260 265 270	
ttc ctt tgt ttc gga aga aga gga gcg ttc tca gca caa cag ttg aaa	864
Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Ala Phe Ser Ala Gln Gln Leu Lys	
275 280 285	
gaa att gcg ata ggg ttg gag aag agt gga tgt cga ttt ctt tgg ttg	912
Glu Ile Ala Ile Gly Leu Glu Lys Ser Gly Cys Arg Phe Leu Trp Leu	
290 295 300	

```

gcc cgc att tca ccg gag atg gac tta aat gcg ctt ctg ccg gag ggt      960
Ala Arg Ile Ser Pro Glu Met Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Glu Gly
305                      310                      315                      320

ttt cta tcg aga act aaa gga gta ggg ttt gtg aca aac aca tgg gtg      1008
Phe Leu Ser Arg Thr Lys Gly Val Gly Phe Val Thr Asn Thr Trp Val
                      325                      330                      335

ccg caa aaa gag gtg ttg agt cat gat gca gtg ggg ggg ttt gtg act      1056
Pro Gln Lys Glu Val Leu Ser His Asp Ala Val Gly Gly Phe Val Thr
                      340                      345                      350

cat tgc ggg tgg agt tcg gtt ctt gaa gcg ctg tcg ttc ggt gtc ccg      1104
His Cys Gly Trp Ser Ser Val Leu Glu Ala Leu Ser Phe Gly Val Pro
                      355                      360                      365

atg att ggt tgg ccg ttg tac gca gag cag agg atc aat agg gtg ttc      1152
Met Ile Gly Trp Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Arg Ile Asn Arg Val Phe
                      370                      375                      380

atg gtg gag gaa ata aag gtg gcg ctg cca ttg gat gag gaa gat gga      1200
Met Val Glu Glu Ile Lys Val Ala Leu Pro Leu Asp Glu Glu Asp Gly
385                      390                      395                      400

ttt gtg acg gcg atg gag ttg gag aag cgc gtc agg gag ttg atg gag      1248
Phe Val Thr Ala Met Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Glu Leu Met Glu
                      405                      410                      415

tcg gta aag ggg aaa gaa gtg aag cgc cgt gtg gcg gaa ttg aaa atc      1296
Ser Val Lys Gly Lys Glu Val Lys Arg Arg Val Ala Glu Leu Lys Ile
                      420                      425                      430

tct aca aag gca gcc gtg agt aaa ggt gga tcg tcc ttg gct tct ttg      1344
Ser Thr Lys Ala Ala Val Ser Lys Gly Gly Ser Ser Leu Ala Ser Leu
                      435                      440                      445

gag aag ttc atc aac tcg gtc act cgt taaag tttcttactc aatatatggt      1396
Glu Lys Phe Ile Asn Ser Val Thr Arg
                      450                      455

acatcggttt aactaccaaaa ttttat      1422

```

<210>2

<211>457

<212>PRT

<213>

<223>Amino acid sequence of 4,2',4',6'-tetrahydroxychalcane 4'-O-glycosyltransferase encoded in pSPB1725

<400>2

```

Met Gly Glu Glu Tyr Lys Lys Thr His Thr Ile Val Phe His Thr Ser
  1              5              10              15
Glu Glu His Leu Asn Ser Ser Ile Ala Leu Ala Lys Phe Ile Thr Lys
      20              25              30
His His Ser Ser Ile Ser Ile Thr Ile Ile Ser Thr Ala Pro Ala Glu
      35              40              45
Ser Ser Glu Val Ala Lys Ile Ile Asn Asn Pro Ser Ile Thr Tyr Arg
      50              55              60
Gly Leu Thr Ala Val Ala Leu Pro Glu Asn Leu Thr Ser Asn Ile Asn
      65              70              75              80
Lys Asn Pro Val Glu Leu Phe Phe Glu Ile Pro Arg Leu Gln Asn Ala
      85              90              95
Asn Leu Arg Glu Ala Leu Leu Asp Ile Ser Arg Lys Ser Asp Ile Lys
      100             105             110
Ala Leu Ile Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ala Ala Phe Glu Val Ser Thr
      115             120             125
Ser Met Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Asp Val Ser Gly Gly Ala Phe Leu
      130             135             140
Leu Cys Thr Phe Leu His His Pro Thr Leu His Gln Thr Val Arg Gly
      145             150             155             160
Asp Ile Ala Asp Leu Asn Asp Ser Val Glu Met Pro Gly Phe Pro Leu
      165             170             175
Ile His Ser Ser Asp Leu Pro Met Ser Leu Phe Tyr Arg Lys Thr Asn
      180             185             190
Val Tyr Lys His Phe Leu Asp Thr Ser Leu Asn Met Arg Lys Ser Ser
      195             200             205
Gly Ile Leu Val Asn Thr Phe Val Ala Leu Glu Phe Arg Ala Lys Glu
      210             215             220
Ala Leu Ser Asn Gly Leu Tyr Gly Pro Thr Pro Pro Leu Tyr Leu Leu
      225             230             235             240
Ser His Thr Ile Ala Glu Pro His Asp Thr Lys Val Leu Val Asn Gln
      245             250             255
His Glu Cys Leu Ser Trp Leu Asp Leu Gln Pro Ser Lys Ser Val Ile

```

260	265	270
Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Ala Phe Ser Ala Gln Gln Leu Lys		
275	280	285
Glu Ile Ala Ile Gly Leu Glu Lys Ser Gly Cys Arg Phe Leu Trp Leu		
290	295	300
Ala Arg Ile Ser Pro Glu Met Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Glu Gly		
305	310	315
Phe Leu Ser Arg Thr Lys Gly Val Gly Phe Val Thr Asn Thr Trp Val		
325	330	335
Pro Gln Lys Glu Val Leu Ser His Asp Ala Val Gly Gly Phe Val Thr		
340	345	350
His Cys Gly Trp Ser Ser Val Leu Glu Ala Leu Ser Phe Gly Val Pro		
355	360	365
Met Ile Gly Trp Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Arg Ile Asn Arg Val Phe		
370	375	380
Met Val Glu Glu Ile Lys Val Ala Leu Pro Leu Asp Glu Glu Asp Gly		
385	390	395
Phe Val Thr Ala Met Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Glu Leu Met Glu		
405	410	415
Ser Val Lys Gly Lys Glu Val Lys Arg Arg Val Ala Glu Leu Lys Ile		
420	425	430
Ser Thr Lys Ala Ala Val Ser Lys Gly Gly Ser Ser Leu Ala Ser Leu		
435	440	445
Glu Lys Phe Ile Asn Ser Val Thr Arg		
450	455	

<210>3

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer for cloning DNA encoding Morning glories 3GGT

<400>3

gaaatggtcg gattggctgg g

<210>4
<211>21
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Morning glories 3GGT
<400>4
acctccaccc caactttcag g 21

<210>5
<211>24
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Petunia 3GT
<400>5
gatgcataat ttggctagaa aagc 24

<210>6
<211>21
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Petunia 3GT
<400>6
ccaatttgcc aaacactttc c 21

<210>7
<211>21

<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Verbena 5GT
<400>7
tgcctcgaat ggttgagcac g 21

<210>8
<211>18
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Verbena 5GT
<400>8
ctctcactct cacacccg 18

<210>9
<211>21
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Baicalein GT
<400>9
cacgaatgct tagcatggct c 21

<210>10
<211>21
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>

<221>

<222>

<223>Primer for cloning DNA encoding Baicalein GT

<400>10

cttattgccc actgaaaccc c

21

<210>11

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer for cloning DNA encoding Gentiana 3'GT

<400>11

tgtctgaatt ggcttgattc c

21

<210>12

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer for cloning DNA encoding Gentiana 3'GT

<400>12

aaccacaga aaccctgtt c

21

<210>13

<211>1446

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB264

<400>13

```

atgggaaaac ttcacattgc cttatttcca gttatggctc atggtcacat gatcccaatg      60
ttggacatgg ccaagctctt tacctcaaga ggcatacaaa caacaatcat ttcgactctc      120
gccttcgctg atccgataaa caaagctcgt gattcgggcc tcgatattgg actaagcatc      180
ctcaaattcc caccagaagg atcaggaata ccagatcaca tggtgagcct tgatctagtt      240
actgaagatt ggctcccaaa gtttgttgag tcattagtct tattacaaga gccagttgag      300
aagcttatcg aagaactaaa gctcgactgt ctcgtttccg acatgttctt gccttggaca      360
gtcgattgtg cggctaagtt cgggtattccg aggttggttt tccacggaac gagcaacttt      420
gcgttgtgtg cttcggagca aatgaagctt cacaagcctt ataagaatgt aacttctgat      480
actgagacat ttgttatacc ggatttcccg catgagctga agtttgtgag gactcaagtg      540
gctccgtttc agcttgcgga aacggagaat ggattctcaa agttgatgaa acagatgacg      600
gagtctgttg gtagaagcta cgggtgtgtg gttaacagtt tttatgagct cgagtcgact      660
tatgtggatt attacagaga ggttttgggt agaaagtctt ggaatatagg gcctctgttg      720
ttatccaaca atggcaatga ggaaaaagta caaaggggaa aggaatctgc gattggcgaa      780
cacgaatgct tggcttggtt gaattccaag aagcagaatt cggttgttta cgtttgtttt      840
ggaagtatgg cgacttttac tccagcgcag ttgcgcgaaa ctgcgattgg actcgaggaa      900
tcaggccaag agttcatttg ggtagttaaa aaggccaaaa acgaagaaga aggaaaagga      960
aaagaagaat ggctgccaga aaattttgag gaaagagtga aagatagagg cttgatcata      1020
agaggatggg cgccgcaatt gttgatactc gatcatcctg cggtaggagc tttcgtgacg      1080
cattgtggat ggaattcgac gttggaagga atatgcgccg gtgtgcctat ggtgacttgg      1140
ccagttttcg cagagcagtt tttcaatgag aagtttgtga cagaggtttt ggggaccggt      1200
gtttcggttg ggaataagaa gtggctaagg gcagcaagtg aagggtgtgtc gagggaggca      1260
gtgacgaacg cgggtgcagcg tgttatggtg ggagaaaatg cgtcggagat gagaaagcga      1320
gcgaagtatt ataaggaaat ggcgaggcgg gcggttgagg aaggcggttc gtcttataat      1380
ggtttgaatg agatgataga ggatttgagt gtgtaccgtg ctccagaaaa acaagactta      1440
aactag                                           1446

```

<210>14

<211>1488

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB662

<400>14

```

atggcctttc aaattcaacc agagcttcta aacttcgttt tcataccatt catggcccct      60
ggccactcaa tccctatgat agacttagcc aaattattcg cggaacgcgg cgtcaacgta      120
acgatcatcg taacacctct taacgccgca cgattcaatt ccgttattaa tcgagccggt      180
gaatcaggac agtccattcg tcttctccaa gtaaaattcc ctggtgaaga agccgggttg      240
ccacctggat gcgaaagcgc cgagacttta ccattctatg aattgattcc aaattttttt      300
accgccgtaa aaatgttaca acaaccaatc gaggaagaat tgagaaattt gatcccttta      360
ccaagctgcg tcatttgtga taaacacata ccctggactg ctcaaacgtg caagaatctc      420
cgaattccga ggataatttt cgatggaatg agctgttttg ctcttttagt aacacacgtt      480
ctctacgtgt ctaaggttca tgaaaccgtt cctccaaacg agccgttcgt tgttcctgat      540
ttccccgatg agatagagtt aacgagggtt caattgccag ggttggtgaa tccaagtcca      600
aggataaatt ttacgattt tcgcgaacaa gtgaagaaaa ctgaggagga ggcttatggg      660
gtggtggtga acagttttga ggagctggaa aaagattatt tcgagatgtt tcggaaattg      720
aaagggggta aagtttgggt tgttgggcct ttgtcgcttt atggtaacga cgatttggac      780
agggctggaa gagggaataa ggcgtcgatt gatacggatc ggtgtatgaa atggcttgat      840
gatatgaaac cagaatctgt aatttatgcc tgtttgggaa gcctgagtcg tttgtcgcgt      900
tcacagttcg tcgaacttgc tttgggattg gaagcatcaa aacactcgtt tgttctagtt      960
gttaaaaccg aaggagagaa gtcgttggaa atagagaaat ggattttgga caatggattc     1020
gaggaaagaa cgaaagatag agggttcttg attcgtggtt ggtcgccaca agtgttgatc     1080
ttgtcgcatt ttgcagtggg aggattcttg acgcattgtg gttggaattc gacgcttgag     1140
ggcatttgtg ctggtttgcc aatggtgatg tggccgatgt tcggcgaaca gtttttgaat     1200
gagaagttag tgggtgcagat tttggggacg ggtgtgggag ttggagcgaa aagtacggta     1260
catttggggg atgaagagat ggatgagatg agagtgcga ggaaggggat taccaaggcg     1320
gtcgtggcag ttatggatag aggaactgaa ggggtgtgaga ggccggagaaa ggcgaaggag     1380
cttggtgaaa tggctaagag ggcagtccaa gttgggggat cttcatgtaa gaatgtcgac     1440
cagctaattc aagaagttgc accattgagt gtagcgaggg atgtgtaa                       1488

```

<210>15

<211>1446

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB1621

<400>15

```

atgggttctc tccctgaaaa tgagctcaac aaaccacatg ctgtgtgcat accctatcca      60

```

gcactagggc atttcagtc catgctagat tttgctaagc tcctccacca aaaaggcttt 120
 cacataacct tegtcaacac cgagtacatc cgtctccgcc tcctcaagtc ctgtggccct 180
 gccgccctgg acgggctacc ggactttcgc ttcattgacta tccccgatgg cctccctttg 240
 teggacgacg tttcgcgatga tgtcgcttcc atttctgtct ctactaaca aacttgctta 300
 gaaccccttt gtgagggtgt atcggaacct atggataatg gttccaaccc gccgggtgagc 360
 tgcatttgtt cgcacggggt aatgagtttc acccttgagg cggcggagag gtttgacttg 420
 ccagagggtgc tgttctggac gcccgctgct tgtggcatct tagctttcac gcagtataag 480
 catcttgttg agagaggata tgtacctctc aaagatacga gccaggtaac aaatggctac 540
 ctggaaacaa tattagattg ggttccaggg atgaaggata ttcgattgag ggaattccca 600
 actttcataa gaacgacgga cccaaacgac gttatgctgg attttctaataaaaacaagtt 660
 gacgccaccc cgaaagccaa tgcgtgtgac atcaacacgt tcgacacatt ggaaagtgc 720
 gctctcaacg cctctctgt catgtttccg cgcatataca cactcgggcc tctccatatg 780
 atgttgaata atcccgaggt cgacgaaccc tctaattgcaa tcaaatttaa tctttggaaa 840
 gaagactcac attgcctaga ttggctcgat gtgaacgagc ccggtatcagt tgtatacgtg 900
 aattttggca gctcaacaat tctgactgtt gaacaactaa ctgaattagc atggggcctt 960
 gctaacagca agaaaccgtt cctttggatc atcaggcctg atttagtaac tgggtgcatcc 1020
 tccatgcttc cgcctgagtt cctggctcgag actaaagaca gaagcatgtt agtgagttgg 1080
 tgcaaccaag aacaagtgtt gaagcacccc gcgactggag tgttcttgac gcattgtgga 1140
 tggaattcga cgattgaaag catttgcagc ggctgtgcaa tgatttggtg gccttactac 1200
 gctgagcagc aaaccaactg taggtacagt tgtgtggaat gggaaatagg aatggagatc 1260
 attgacaacg atgtgaagag agatgaggtg gaattgctgg tgattaagtt gatggatggt 1320
 atcaaggga agaaaaatgaa aaagaaagct atggagtgga agaggaaagc agaagaggcg 1380
 gtagcttttg ggggctcttc ctacatgaat ttggataaac ttattagcga cgtgcttttt 1440
 ccataa 1446

<210>16

<211>1458

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB1620

<400>16

atggcaggtc caaattgcaa gcctcacgcc atcatgatcg cacttcctta ccaaggccac 60
 ataactcctt ttgtcaatct tgcactaaaa cttgcttcca atggctttac aatcactttt 120

```

gttcaccttg aatttatcca ccaaatgttg tctaaagccc ataacgccac taaaactgaa 180
gcagatttat ttctggaagc acgagaatcc ggtctcgaca tacgttacac aacgattgac 240
gatggtttcc ctttgggaatt cgacagggct ctccactccg aggagtattg gcactccatg 300
ttgcgagatt tcccgttaca cgtcgatgag tttgttcgaa aagtcgtgga gtcagagcca 360
tttttagagc acttttttggg tacggatact atgtatacat ggccctgcaac cattgcaaag 420
aaacataatc ttgtgaatat ttcgttttgg actgaaccag ccctgggtgtt ttctttgtct 480
taccatataa accttctgaa gcaaaatggg cattttccat gtaaagaaaa tattgatgag 540
gaaataaatt acgtaccagg agttgattca ataagtacaa gggatttaat gtcttatttt 600
aaagaaccag gatcagaaac attagagaaa aatgttgtgc tcaaggcatt tgaaggagtg 660
aagaaagctg atttcatctt gcataacaca ttgcaagaac tagaatctga gacactctca 720
gctcttacca aaatgcagcc aaattacgcc gttggacctt ttaatttctc caaacatact 780
cctaaaactg tcaccaagag tctacgggtc gaattcgact gcaccaactg gctcgactct 840
aagcctccca actctatttt atacgtctcg tttggtagtt ttattcagac aagcaaagag 900
gtaattgaag aaatcgctta cggctcttct cttagtgaag ttaactttat atgggttggtt 960
agaacagata gtgtgagttt agaggataac gaggttttgc cggttggatt tagggatgag 1020
gttaaagata ggggggtgat agttccgtgg tgtgatcaaa ttacggtttt gtctaatacg 1080
gcggttggag gattcttgac gcattgtgga tggaactcgg tattagagag tatgtggtgt 1140
ggcgttccta tgatttgta tccgttaaca tatgatcaac ctactaatag gaaactattg 1200
gttgatgatt ggaagattgg cattaatctt tgcgacggag cggttgattaa tagaaaagaa 1260
attgcagaga agattaaggc cttgatgagt gaaagtactt cagaggggtt gaggggaagaa 1320
tctgagaaag ttaagggtt gttgaagaat gcaactggaag ttggtggttc atcagagaag 1380
aatttcaata aatttattga ggatttgaag gcaaaaattc aaataatgaa agagcaaattg 1440
cctgctaata ccagttga 1458

```

<210>17

<211>1443

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB1622

<400>17

```

atgggttcca cagccgaaaa taaacagaaa acccacattg tgtgcatacc ctaccagacc 60
caggggcaca tcagcccat gctaaagtta gccaaactgc tacaccaaaa cggtttttac 120
atcacttttg tcaacacgga gtacaaccac cgccgcctca tcaagtcctg cggtccacc 180

```

```

gccctcgacg gattgcccga tttccgggtc gttacgatcc ccgacgggct tcctttctct 240
gaagccgacg ccacacagga tatcccttct ctttgtgttt caaccaccaa cacttgcttg 300
gagccctttt gcgagctgct gtcgaacctc aataactccg gcccggaagt gccccgggtg 360
agctgcatcg tatccgatgg tgtcatgagc ttcacgttga aggcggcgga gagatttggg 420
ctgccggagg tgctgttctg gacgacgagt gcgtgtgggt tcttggcgta tacgcagtat 480
aagcatctcg tggagaaagg ctatgtacct ctcaaagata tgagccaagt aacggatgga 540
tatttgaana caagcatgga ctggattcca ggaacgaagg acatccaact aagggaactt 600
ccctctttca tcaggacaac agatccagaa gacatcatgc ttaatttttt aatacaagaa 660
actgatgttg ttccgagagc caaagctgta ataataca ccttcgacat gttagaacac 720
gacgtcctgg aagcgctctc caccatgttt tcacgcgttt acagcatcgg ccctcttcag 780
ctgatgatga attatgttca caacgagtcc cttaaatacca tcagttccag tctatggaaa 840
gaagaaacac attgcgtcga ttggctcgat tcaaaggagc ccgaatccgt tgtgtacgta 900
aattttggca gcataactgt cgtgactgca gaacaactga ctgagtttgc gtggggggctc 960
gctaatagta agaagacttt cctatgggtt attaggcctg atatagttagc tggagactcg 1020
gctatgctgc cccctgaatt cgtgacgggg acaaaagata gaagcatgtt aatcagctgg 1080
tgtaaccaag aacaggtgtt gaatcaccca tcaattggag ggtttttgac gcacagtgg 1140
tggaattcga cgattgaaag tatagtcgag ggagttcctg tgatttgctg gcctttcttt 1200
gctgagcagc aaacaaattg taggttcagt tgcgtggaat gggaaatagg aatggagatt 1260
gataataatg tgaagagaga tgaggttgaa gttttggtga gggaattgat ggatggagag 1320
agggggaaga aaatgaagga gaaagctatg gagtggaaag ggaaagcatt agaggcaact 1380
gcacttgggg gctcttccta cttgaacttg gaaaaactaa ttaaggaggt gcttttgc 1440
taa 1443

```

<210>18

<211>1407

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB1610

<400>18

```

atggcatctt ctcccataa ccagccaacc acgccccgcc acgtggtggc cctaccctac 60
cccgcccgcg gccacataaa ccccatgctc aacatctgca aagccgtagc ggagaagagc 120
agccacatca acataacaat cctcctaacc gaggaatggc tcggcttaat cggctcagcc 180
gacaagccgc cgaacataag ctacgccgcg ataccgaaca ttctgccgtc ggagcacgtt 240

```



```

cgcgggcgagg atccacatgg tttttgggcg gctgtttggc agaagatgga ggagccggtt 300
gatcggctgc tggacgagct tcggcttaat aataacaagc cggagtttgt gatagccgat 360
gctttcttgc attgggcggc tgacgtggcg ggcaggagga atattccctt ggcattctgtt 420
tggccaatgt cggcgtccac gttcacgggtg ctttaccact ttgaccttct cgttgaccac 480
ggacactttc cgatcgacat accagtgaat ggagatgcta ttgtggatta catcccggga 540
ctccctccag ttcgcgtcgc agattttcca aaagacataa gaaaacaaga agacgcatcc 600
ttcgtcctta aactcattcc caactcacca aaattcatca tcttcacttc aatttacgac 660
ctcgaatcca agatcatcga cgctctaaag caaaaatctt ccttctcaat ctacaacatt 720
ggtcctcatg cttcctatcc caaactcaaa cacatcctca actcggataa aatcacgaaa 780
cctgatcaag ataaccccgga ctacttaaaa tggtttagatc tccaacctcc caactccgtc 840
ttgtacattt cactcggcag tttcctatcc atttcgcgag cccaaatgga tgaactcgca 900
accggaatac gaaactctgg tgtccgcttt ttgtgggtgg cacgtggcga aacaaaccgg 960
ttgaaagaga tttgttgtga tcatgaaaag gggctgatca tagaatgggtg cgatcaaattg 1020
caggttcttt ctcatcttcc ggttggtgga ttcttgtcgc attgtggttg gaattcgact 1080
aaagaggcgt tgatggccgg ggtgccgttt ttgactattc caattatgtt tgatcaagtg 1140
tctaacgcga aggcggtcgt ggaagattgg aggggtgggt ggagggtggt gaatgagttt 1200
aatgaagaag agttggtggg aggagatgag attgcgaata ttgtgaggag gtttatggat 1260
atggaaaatg gtgagaggaa agagttgacg aaaaatgtga aagaggtgca gaagatttgt 1320
gcgagagagt tcgaagatgg agatggacag tcgtttgagt ttaatgttga aagtttggtt 1380
caattgattc tgcaattggg tccgtaa 1407

```

<210>19

<211>1428

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB1609

<400>19

```

atgaacaaca caacccaaca acaaacagta gcattagcac tagcacctca ctgtttaatc 60
gtcccatctc cattccaagg ccacattaac cccttactcc aattcgccaa acgctcata 120
actcaccaca aaaaaaacct ccaaatacaca ttgcactca ccaaattcat cctcaccac 180
ctctctctcg gtgccggaga atcatccttc tctctccggt caatctccga cggcttcgac 240
gccggcggcc gcgctcaggc caactccggc gccgaatacc tctccaaatt ccgcgagatc 300
ggatctcaaa ccctaaccga acttatccaa gacctatccg aatcgggtcg acccgttgac 360

```

tgcggtggtct acgacccggtt cgtaccttgg gccttagatg ttgccaaggg taaattcgga	420
atttcaacgg cggcggttttt tacgcagtcg tgtgcggtgg ataatatata cagtcgggtt	480
tataacggcg atttggagct gccgttgccg gagaatgagg tggttagggt tccgggtttg	540
ccggagatgg agccggttga gatgccgagc tttgtgtatt taaacgggtc gtacccgtcg	600
agttttgaga tggttgtggg tcagtttagg aatgttgatg aggcggttgg ggtttttgtc	660
aacacttttt atgagttgga gaaagagggtc attgactgga tgtcaaaatc ttggcgagtg	720
aaagcaattg gacctacat accatcaatg ttcattggaca agagattgca agaggacaaa	780
tcatacggtc ttagcatgtt caagcataca acaaatgact gcataaattg gctcaacgga	840
aaacaatcaa aatccgtcat ttatgtcgca tttggaagtc ttgcagaatt atcccacgac	900
caaactcaag aactggcaca cgccttaaca acctacgaca aacacttctt atgggttgta	960
cgatcatcgg aagaagctaa gcttcccca aattttgcta acgaaacatc taagaaaggg	1020
ttgatagtgt cgtgggtgcc tcaattagag gtcttgtcgc acgaggccat cggttgtttc	1080
gtgactcatt gtggttgga ttcaacgctc gagggattga gtttgggggt gcctatggtg	1140
gcgatgccac agtggacgga tcagagtacg aacgctaagt ttatcgtgga tgtttgggt	1200
gtgggtgttc gggctaaggt ggacgagggg ggattagcga ggcaagatga gatagttcgt	1260
tgcttaggga gcgtcatgga aggggagaac ggagaaaaga taagaaagaa tgcgaatgaa	1320
tggaaggaac gggcggtgca tgcagttgat gaagggggga gttcagacaa aaatattgaa	1380
gaatttgta ctacgttgat aagttcccat gacttgcgtc aagagtaa	1428

<210>20

<211>1425

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB1617

<400>20

atgtctagtg agagccaaat aaacttagtg ttcattccctc tccctgtaaa gggacacatt	60
gtctcaacgc tagagacggc aaagctactc gtcgatcgaa acaaacgcct caccatcaca	120
atcctcctca tgaagctgcc agtcgacgcc aaggtagatg attccttcac aaaaaatccc	180
tcctgctctc aaataacttt tgtacatctc cctcgaatcg agcacagttc catggaacca	240
ccgggaactc ccgaatcctt tgtacacagg ttcgtcgaga gccaaaaatg tctcgtaaga	300
gatgcggtgg ttaaagcaac ggagggctca aatcaaaca ggctagccgg atttgtaatc	360
gacatgttct gcaccccgat gattgatgtg gccaatgaat ttggcgctcc gacatacgtg	420
gcittcacgt ccggggccgc aactctcggg ctattgttcc atttgcagag tcttagagat	480

```

gaattttaatc aggacgtgaa ggagtacgag aactcggaag ttgagatata gatccccgct 540
tatgttaacc cgttcccttc caaatccttg cegtctctctg tcttcaacga ggacgggtgtt 600
tttcttagtc ttgcaaaggg gttcagagag gctaaaggta tattgatcaa caccttttta 660
gaatttgaat cccatgccat taaatcgctc tccaacgatg cgagaatccc gcctgtttac 720
cccatcgggc cagtaattca cgccacggaa gataatgcaa acaaaggaaa gcaggacgaa 780
atcatcgctg ggcttgacga gcaacctgat tcatccgtcg tgtttctttg cttcggaagc 840
gctggatgct ttgaagaaaa tcaagtgaag gagattgcag tggcgctcga caaaagtgga 900
taccggtttt tatggtcatt gagaaagccg cctcccaaag aaaaagcgga gtttccaggg 960
gagtacaaag attttaatga agttttacca gaagggttct tacaacgtac gtccgggaga 1020
ggtaaggtaa taggatgggc tccgcagatg gccgtgttgt ctcacaatgc ggtgggagga 1080
ttcgtgtcgc attgcggctg gaactcgacg ttggagagtg tttggtgcgg agtgccaatg 1140
gccgtgtggc cattggcggc cgagcaacat gcgaacgcgt tccagttggt gaaggagttg 1200
ggaattgcgg tggagattaa gatggattat aggaagaaca gtggtgtgat tgtggaggca 1260
aaaatgattg agaaaggaat cagggagttg atggaccgga aaaatgagat aaggggtaat 1320
gtgaaagtga tgaaaaagga gagtaggaNa gctgtcgtgg atggtgggac ttcttttgat 1380
tacttggatc gttttgttga aactgtcgtg aataatgttt tgtga 1425

```

<210>21

<211>1446

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB1615

<400>21

```

atgggttccg tagccggaag cagttacaaa cggcctcatg ctgtgtgcat acccttcccg 60
gcgcaggggc acatcaaccc catgctgaag ttggccaaac tctccacca aaagggttc 120
cacatcacat tcgtcaacac agagtacaac caccgccgct tgctcaagtc cctcggtccc 180
gacgtctcgc atggcttgcc ggatttccga ttgcgaacca tccccgacgg tcttctccg 240
tctgacgcgg acgtcactca ggatgttcc tctctttgta tgccaccac taacacttgc 300
ttggagccct ttaccgagtt gctgttgaaa ctcaataact cgggcccgga cgtgccaccg 360
gtgacctgca tcgtctcgga tgggtgtcatg agcttcacat tgaaggcggc ggagaggttt 420
gcgctgccgg aagtgtgtt ctggacgacg agtgcgtgtg gtttcttggc gtacacgcag 480
tataagcgtc tcttggagaa aggctatgtc cctctcaaag atatgagcca gtaacaaat 540
agctatctgg aaacaaccct cgactggggt ccaggaatga aggatatccg attaagggac 600

```

```

ttcccatcat tcatcaggac aacggatcca aaagacatca tgtacaattt cgtattacaa 660
gaaaccgacg ctgtctccag agccaaagct ctgatcatca acacctttca tacattggaa 720
cacgacgttg taaatgccct ctccaccatg tttccacgtg tttacaccat cggctctctt 780
cagctgatgt tggaccaagt tcatgacaag agccttaacg ccatcaactc caatctctgg 840
aaagaagaat cgcaatgcat cgattggctc aattcaaaag agcccgaatc cgttgtgtat 900
gtgaatttcg gtagtgtcac tgttgtgact gctcaacaac tgacggaatt tgcgtggggg 960
cttgccaaca gcaacaagac ttttttatgg gttattaggc ctgatatagt tgttgagac 1020
tcggcaatgc tgccccctga attcttgacg gacacggaag acagaagcat gctaataagc 1080
tggtgtaacc aagaacaggt gttgaggcac ccttccatcc gaggatTTTT gacgcacagt 1140
ggttggaaact cgacgcttga aagtattgtc agcggagtgc ctatgatatg ttggcctttc 1200
tttgctgagc aacagacaaa ttgtaggttc agttgcgtgg aatgggaaat aggaatggag 1260
attgacaata atgtgaagag agatgaggtt gaggtgctgg tgagagagtt gatggatggt 1320
gaaaagggga agaaaatgaa gaagaaagct atggagtgga agatgaaagc agaagcagca 1380
gctgccccctg ggggaccttc gtctttaaat ttggaaaaac ttattgagga ggtgcttttg 1440
caataa 1446

```

<210>22

<211>1308

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB660

<400>22

```

atgaaggctc atgcagtgat gcttccttgc cccgtacaag ggcacttaaa tcctatgctg 60
aaactggcca aaatatttga ttcaagaggc ttcttcatca cattcgtgaa cacggaattc 120
aatcacaatc gtctagtgcg tgcgagaggc cccgaatctg ttaaaggctg cgatgatTTT 180
cagttcaaaa ccataacctga tggactaccg ccttttgata aggacgcaac gcaagacata 240
cctcaactgt gtgattctct tcaaaagaat ggtcttctc cattgttgga cctcattaaa 300
agtattaatg attcaccgga ctgtccaaat gttacctgta tagtgattga tttggccatg 360
agtttcgctc ttgatgcggc cgagggtgtt aaaattccca cgggtgtactt ttcgccaact 420
agtgccttgt gattcatggg gttttgcaat tatgaagagc ttgtgaatcg aggattgttt 480
ccacttaaag atgaaagtca aataactaat ggctatcttg ataccaaact agactgggtg 540
ccagggatga agaacattag gctcagagat tttcctagtt tcatccgaac gactgatcca 600
gatgatatca tgggtgaactt catgatTTTT aacatgaaga atgcgcctcg tgcaaaggct 660

```

gtggtagtca acacattcga tgaattggag aaagatgtat tggaggccct aagtaaaaaa	720
tttgatcatg ttttttccat aggcccactc caattgatgg agaaggcttt ccaaagcct	780
gaggtaaaat ctataggatc aagcttgttg aaagaagaca acacgtgcat cgcctggctc	840
aacggcaggg agccaaattc tgtgttgtac gtgaactttg gaagcatcac agtgttgtca	900
cctcaacaac tattggagtt cgcattgggc ctagccaata gcaaccatta ctttttgttg	960
atcataaggc cagatttggt aagtggagaa tctgcgattt tatccgaaga gtactcaaag	1020
gaagttgaag ggcgggcat gatgggtgct tgggtgctctc aagagcaagt attggcccat	1080
ccttcggtag gtggattctt gacacattct ggctggaact cgactatcga aggaatgtca	1140
gaaggtgttc ctatgatttg ttggcctttt ttgtctgacc aacagaccaa ttgtcggtat	1200
gcatgcacgg agtgggagat tggaatggag attgaaggag aggttacgag ggataaagtg	1260
gcggatttgg tgaatatatt gatggaggag ggaaggggag agcgatga	1308

<210>23

<211>1506

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB658

<400>23

atggccattc atgaacaaaa acctcacttt gtcctgttcc ctttcatggc acaaggccat	60
atgattccca tggtagatat cgccagatta ctgcggaagc gcggtgtcac aatcaccatt	120
ctactcacac ccacaaatgc caacagggtc aaaacagtca ttgctcgtgc aatcgattca	180
ggactaaata tcaatgtcat ccacttcaaa tttccatccg ttgaggtcgg attgcccga	240
ggttgtgaga atttcgatat gctccctgac atcaatggcg cattgcagtt tttcaaagcc	300
actttcatgt tacaagaaca ggtcgaagag ttgcttccaa agctcgagcc tcttccgagc	360
tgcctaattg ctgatatttg ctttccatgg acaacaaatc ttgctttgaa gttaaattgtt	420
ccaagaattg tgtttcacgg gacaagttgc ttttctctcc tatgtatgca cgttttagga	480
acttctaagg atttcgaagg tgtgactaac gaaacggagt acttccttgt gcctggatta	540
ccagataaaa tcgaaataac caaaattcag cttaggggca cccttattca aatgaattca	600
gactggacga agtttcgtga tgaggtgcga gaggtgagg taaaagcatt tggaacggtg	660
gccaatactt ttgaagattt ggaaccagag tatgtcaaag aatacagcag agttaaaggc	720
aaaaaagtct ggtgcatagg tcctgtttca ttatgaaca aagatggcat agacaaggcc	780
gaaagaggta acatggcttc aatcgacgca caccattgct tgaagtggct caattcacac	840
gaacaaaagt ctgttattta cgtctgcctt ggaagcatat ctgcctcgc tacttcacaa	900

```

ctgatagagc ttggattggc tttagaagca tcaaacagac cttttatttg ggtagttaga      960
gatccatcac aagaacttaa aaaatggttt ttgaatgaga aatttgagga aagggtaaag      1020
gatagaggcc ttttgatcaa cggttgggcg cctcaagtgc tcatactttc ccatccatct      1080
gttggagggt ttgtaacgca ctgcggctgg aactcgatgc ttgaaggggt tacttcaggc      1140
ttgccgatga taacgtggcc tgtatttgct gagcagtttt gtaatgaaaa gtttattggt      1200
cacgtgatca agactgggat aagagtgggt gttgaagtgc ctatcatctt tggagatgaa      1260
gaaaaagtcg gagttttggt gaagaatgat gagataaaga tggttataga taagttgatg      1320
gatggaggag aagagggaga agagagaaga gagagagctc aaaagcttgg agaaatggca      1380
aaaaaggcaa tggaggaggg tggttcttct tadcataatt tgacatcggt catgcaagat      1440
gtcatgatgc aacaagctaa taatggagat caatatgaag atggtgttac agttataaat      1500
acatga                                          1506

```

<210>24

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer 1617BamHINcoI-FW

<400>24

```

gggggatcca tggctagtga gagccaaata                                          30

```

<210>25

<211>36

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer 1617XhoIKpnI-RV

<400>25

```

cccctcgagg gtacctcaca aaacattatt cacgac                                          36

```

<210>26

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer 1617-F

<400>26

atgggagaag aatacaagaa aaca

24

<210>27

<211>26

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer 1617-R

<400>27

taaaatttgg tagttaaacc gatgta

26

<210>28

<211>1386

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB1721

<400>28

atgctgagcc tcgccaaaat tctgcaccaa aagggtattcc atatcacttt cgtaaact 60

gaatttaacc atgaacgcct cctgagaacg agaggcccga attcccttga cgggttgcct 120

tcgtttcgat tcgagacaat tcccgcgggt cttccgccat cagaccccga tgctacacaa 180

aacgttgcct tattgtttga gtccagcaca tccaaatgct tagctccatt caggacatt 240

cttgctaagc taaaccacac cgacgtgccg ccagttactt gcatactatc cgacttaatc 300

atgagcttca ctcttgaagc tgctcaagag ctgagcatcc ctgatgtcct tttttggacc 360

gctagcgctt gtggatacct cgcttatgca cactatgccg cgcttattga aaaaggattt 420

```

acacctttca aagatacgag ttgcttgacc aatgggtatt tggataccgt tattgatgat 480
attcctagtc tggaaggcat acgtctgaga gacattccaa gttttatcag aacaactaat 540
ccagatgaca ttttgatgaa ctttgtgttg cgagaaacag agagagctag aaaagggttc 600
gccgtaatct ttaacacgtt cgagtgcctc gaggttgaag cattaaacgt actttcatcc 660
atgttgcctc cagtttacac agttggaccc ctgcatttgg ttgaaaagca tgttggtcac 720
aaaggattgg aggtgcttgg atcaaattta tggaaagaag agccaaaatg tctcgaatgg 780
cttgactccc aaattcccaa ctgagtgggt tacgttaatt ttggaagcat cgctgtcatg 840
acaactgacc aactgattga gttttcttgg ggtcttgcta atagcaacat atccttcttg 900
tggattataa gacctgacct tgtctcaggg gaaaacgctg ttcttccacc cgaatttctc 960
gaagccacaa aagaaagagg gtgttttagca aattggtgcc ctcaagagaa agttcttagc 1020
cacccatcca tcagaggatt cttaactcac agcggatgga attcaactct tgagagcatt 1080
tgcagtggag ttccaatgat cagttggccg ttcttcgccg aacaacagac taactgttgg 1140
ttttgctgca caaatgggg cataggcata gagctagaca atgatgtcaa aagggataaa 1200
gtggaagacc ttgtgcgca attgatgtct ggggataaag ggaaagagat tatgaaaatg 1260
gctatggagt ggaagaagct ggccgaagag tctgccaga gttcatcttt taagaatcta 1320
gagaaagtga ttcatgaagt gcttttacca ccactacaag tgtgggatcc taaggattcc 1380
acctaa 1386

```

<210>29

<211>1374

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB1724

<400>29

```

atggaggaca ctatcgttct ctacgttca gcagagcacc ttaactccat gctactactc 60
ggcaaaactca tcaacaaaca ccaccccaca atctccgtcg ccattatcag caccgcccc 120
aacgccgccg ctagttccgt cgccgacgtg gcggccatat cttatcagca actcaaaccg 180
gccactctcc cttcggtatct aaccaaaaaac ccaatcgagc tcttcttcga aatcccacgt 240
ctacataatc ctaacttget cgaagcgctg gaagaactgt cactaaaatc aaaagtaagg 300
gcatttgtga tagatttctt ttgcaatccc gcatttgagg tttcgactag cttgaacata 360
cccacttact tctatgtcag cagcggcgcg tttgggctat gcgggttctt gcattttccg 420
acaatcgacg aaactgtcga aaaagacatc ggtgaactga acgatatctt ggagatcccg 480
ggttgcccc cggttttgtc ctcggatttt ccgaaaggta tgttctttcg caagagtaac 540

```



```

acttacaagc atttttttaga cacggcgaaa aacatgagga gagcgaaagg gatcgtggtg      600
aacgccttcg acgcgatgga gttccgagct aaagaagccc tcgtcaacaa tctgtgcgta      660
cccaattcgc caactcccc agtttttctta gtcggcccat tggtcggagc aagcacaact      720
acgaaaacca caaacgaaca gcacgaatgc ttgaaatggc tggacgtgca gccagacaga      780
agcgtgatct tcttatgttt cggtaggagg ggtttgttct ccgcagacca attgaaggaa      840
atcgcaattg gtctggagaa cagcggccac aggttcctgt ggtccgtgcg ttgccacca      900
agtaagccta actcttataa cactgatccg gacctggacg agctcctgcc cgaggggttt      960
ttgtccagga ccgagacccg gggtttcgtg atcaagtcgt gggcgccctca gaaggaggtg     1020
ctgagccatg gcgcggttgg agggttcgtg acgcactgtg ggaggagtgc gatattggaa     1080
gcggtgtcgt ttgggggtgcc gatgatcggg tggccgatat acgcggagca gaggatgaat     1140
aggggtgttca tgggtggagga gatgaagggt gcgttgcagt tggatgaggt ggaggaaggg     1200
ttcgtggcgg cgggtggaatt ggagaagaga gtgaaggagt tgatggattc gaagaatggg     1260
agagcggtta ggcagagagt gaaggagatg aaagtggcgg ctgaggtggc ggttgaaaag     1320
ggtggttcgt cagttgtggc gttgcaacgc tttgttgata tggtggtttc ttaa           1374

```

<210>30

<211>1362

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB1723

<400>30

```

atggaggcag acaaagaaaa tctcaagatt ttaatgttcc catggttggc tcatggtcat      60
atattttccat ttcttgagct agccaaaaga atcttgaagc gaaaaaactg gcacatatac     120
ttgtgtacca cagccataaa cttcagttct atcaacaact tcattgaaaa atataagttg     180
gagaactcaa tagaagtagt agaactccat atagaaccat cccctgaact tccacctcat     240
taccacacta caaagaattt gccacaagt ctcaattcta ccctattaaa ggccattcag     300
acgtcgaatt cgagcttctc agacatcatc agaacattga aacctgaact agtgatatat     360
gatgtgtttc aaccttgggc tgccaagatt gcttcctcac aaggatttcc tgctgtttat     420
ttttctagct ttggaggggc accattatca cttatgcac atcaccacac gtacggaaaa     480
cccgaatttc cttccaagc aatagttgtt gaggacatcg aactggaaag tttgctctct     540
ttgtttgatt tcttgtatgc caacatattt gaagtggatc aagattatct ttttgggaat     600
ttcaagcaat cttgtgagct tgttttgtta aagagtagta aagggttga gaggaagtac     660
atcgattatc tttcatcttt gtctcagaaa aaaatattac ctgttggacc actagtcaca     720

```

gttgacaata agaccaatga ggagaattcc gagatcatga attggttgag caagaaaaaa	780
caccattcaa ctgtctacat ttccttcggt agtgaatact tcctgtctaa agaagagatt	840
gaagagatag caaaagggct tgagctttgt gatgttaact ttatatggat catcagattt	900
ccagttggag tgaccgttaa cttagaagaa aactgcctc aaggtttcct tcaaaggggtg	960
aacgaacggg ggatgggtgt ttcaggatgg gcaccacaga gcaacatatt agcacatcca	1020
agcacaggag gctttgtgag tcaactgtggg tggagtctta tcacagaaag cgtatatattt	1080
ggtgttccgg tcatagggat ggcaatgaaa cttgatcagc caataaacgc cagaatgtta	1140
tcagaggctg gtagtttgtt cgaagtcaaa agatatgaaa atgaagtgtt taggggagaa	1200
gagatagcga aggcgataaa gaaggtgatt gttgaggaca gtggagaaag gctgcggcaa	1260
agagctttag aattgagcga gaagatgaaa atggaagagg aaaatgagat ggatgaagta	1320
actgagcagc tgtgggagct ttgcttgacg aaaaaacggt aa	1362

<210>31

<211>1437

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB1719

<400>31

atggaacctc atatagttat attcccgttc atgtccaaag gccacacaat cctctctctc	60
cacctctccc acctctcct tagtcgcgga gtacgcgtaa cgatcttcac cactgcacaa	120
aaccaccctt tcatcgctca acatgtccca aaaacaaata atgttaccat cattgacctt	180
ccgttccctg ataacatccc tggaatttca ccaggaacgg agagcacgga caaactcccg	240
tcgatgtctc tcttcgtccc gttcgtgaac gccgctaaat cgatgcaacc gttcttcgaa	300
gatgagcttg agaaaattca ttcaggggtt agttgtgtta tatcggatgg tttcttcat	360
tggacgctga aatcagcatc caagttcgga attccacgac tgagtttcta cggtatgagc	420
tactatgcct tgacaatttt tcgagtcgct atctcaaaca agttaatatc attgcacgag	480
tcaccgcacg aggcattcac cttacctagt tttccttgga ttaaactcac tagagatcac	540
ttcgacaaac cacttgatca acgtgaacca aatggtcgc aatttgactt tttcatggaa	600
gcaacgacag ctactgtgaa tagctatggg ttcttagtga atagcttcta tgagcttgaa	660
ccaactttcg cggattacta tgacaacaat tacaaacca aggcggtggag tgcgggcct	720
ctctgcctcg cacaaacgcc aaagaatgat aatctctcgt cgaagcctga gtggattcat	780
tggcttgacc aaaagttgga acaagatcgc cctgttttgt acattgcatt cggatcacia	840
gcagaaatta cactagaaca gttacatgaa atctcacgag ggttggaaga gtcaaagtta	900

cactttttgt gggttttaag gaacaatgga gttgaactaa gtgatggatt tgaagacagg 960
 gttaagaata gaggaattgt agtaaaagaa tgggttgatc aaagagagat tcttgaacat 1020
 gaaagtgtaa aaggctttct aagtcattgc ggctggaatt cggtaatgga aggtatatgt 1080
 gcggagggtc tgattcttgc gtggccaatg atagcggagc aacacttgaa tgcaaagatg 1140
 gtgagtgaag aaataaagat tggtttgaga gttgaaacgg ttgatggaac ggcaaaggga 1200
 tttgtgactg cggcgagttt gacgaaggcg gtgatggaat tgatggaggg tgagaagggg 1260
 aaggaattga gggagaatgt gaagaaagtg gcgggggcag cgagggaagc ggtggtggaa 1320
 ggtggttcgt cgtggaatgg tttgaatgaa ctcatlgatg aggtgtgtag gcataaggaa 1380
 atgagtggta gttctaaagt tgatgaaaac aagagggaaa ttaaggatat taattaa 1437

<210>32

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer 1725-NcoI

<400>32

cccatgggag aagaatacaa gaaa

24

<210>33

<211>26

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer 1725-KpnI

<400>33

ggtacctata aaatttggtg gttaaa

26

<210>34

<211>1080

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>GAPDH

<400>34

```

caccgattac atgacgtaca tgttcaagta cgacagtgtt catggtcagt ggaaacacca      60
cgagttgaag gtacaggatg agaagaccct tctgttttgt gaaaagccag taagagtctt      120
gtcaactggg gtcttcacgg acaaagataa ggctgctgct cacttgaagg gtggtgccaa      180
gaaggttgtg atctcagcac caagcaaaga tgcaccaatg tttgtttgtg gtgtcaatga      240
gaaggaatac aaaccagagt tggacattgt ttccaatgct agttgacta ccaattgcct      300
tgcccccttg gccaaaggta ttaatgatag atttggaatt gttgagggcc tcatgaccac      360
cgtccactct attaccgcaa ctcaaaagac tgtcgatggg ccatcgagca aggactggag      420
aggtggaaga gctgcatcgt tcaacattat cccagcagc actgggtgcag ctaaggctgt      480
tggtaaagtg ctcccagttc tcaatggaaa gctaacggga atggccttcc gtgttcctac      540
tgtcgatgtc tccgtagtgg acctcactgt caggctcgag aaagaggcca cttatgatga      600
gatcaaagct gctatcaagg aggaatccga gggcaacctt aagggcattt tgggctatac      660
cgaagatgat gtggtgtcaa cagactttgt tggatgatag cgatcaagca ttttcgatgc      720
caaggctgga attgcattga gcaagacgtt tgtgaagcct gtgtcgttgt acgacaacga      780
atgggggttac agttcccgtg tgatcgacct gatcgtgcac atggcctcag tttctaaggc      840
ttgatcgatg atctgcttag gccgtgaagc agcttttgtc ttatcgcatc ttttctgagt      900
ttgtaataat gggcttttgt gttatttgca gcctaatttt gcagtttgca aatttatggg      960
ttttggttat gttttgctga aacctatatt attacccttt cgcgttgggt tattgaatgt     1020
gaactctttt tactgatgtg tttaacgttc tctcttttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa     1080

```

<210>35

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer AmGAPDH-F

<400>35

tgttgctgtt aacgatccat

20

<210>36

<211>18
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer AmGAPDH-R
<400>36
agctcttcca cctctcca 18

<210>37
<211>24
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer AmAS-F
<400>37
atgttcaaaa atcctaatat ccgc 24

<210>38
<211>25
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer AmAS-R
<400>38
ttagccatca agctcaatct tgaca 25

<210>39
<211>16
<212>DNA
<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>M13 reverse primer

<400>39

aacagctatg accatg

16

<210>40

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer ThDFR-NcoI

<400>40

gctttacat ggagtaatga gctt

24

<210>41

<211>1367

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB266(ThF3H)

<400>41

gtatgtatgt atgtatgcta tatacgagtc gataaagttg atcgttttca ttttcgacaa 60

atacaaacct cgtgagagaa tcttctcgat catatggcac gagcaggacc actaacccta 120

acttcgctag cgctcgagaa atcgctgcat gaaaagttaa taaggagcga agacgagagg 180

cctaacttag catacgatca atttagcagt cagattccat tgatctctct ctctgggatac 240

gacgatgaat gtaataagag gaaagagctg tgcaagagaa tagcgcaggc atgcgaagat 300

tggggatattt ttcaagtgat cgatcatggg atcgatttga aactcgtcaa cgatatgact 360

cgtttggctc gtgagttctt cgatttgccc gacgaagaga agctgagggt cgatatgtct 420

ggtgggagaa aaggagggtt cattgtttcg agccaccttc agggcgagggt ggtccaagac 480

tggcgcgaga tcgtgaccta cttcacatac cctatcaaag gccgtgacta ttccctgtgg 540

```

cccgacaagc ccgaggcatg gcgggccgtg acagagacct acagctcgca gctaattgtgc 600
ctgggctgca aattgctagg aatcctatcc gaggcaatgg gcctcgaaag agaagcgctg 660
accaaggcct gtctgaacat ggaccaaaaa gttgtggtca acttttacct aaaatgccct 720
cagcccaatt tgacattggg cctgaagagg cactcggacc caggtttgat cactctgctg 780
tttcaggata acgttggcgg gcttcaagcg actcgagacg gcgggaagtc gtggatcacg 840
gtccagcccg ttgagggtgc attcgtggtc aatcttggtg attttgctca ttacttgagc 900
aatggaaggt tcaagaacgc ggatcatcga gcggtggtga attcaaacac gaatagaatg 960
tcgatcgca cgtttcaaaa cccatcgcca gaggctatcg tgtaccctct caagatcgga 1020
gacgacggga agccattat agaaaagccc atcacttatg gagaaatgta caagaggaag 1080
atggctaaag acattgaact tgccaagctc aagaagctag ccaaggaaca aaagttgcaa 1140
gaagaagttg ttaataatgt tgaagatcat catcttaaca atgggaaaac taaataggag 1200
gttaaggtct ttaaggaaac tgacgttgtc ttgtgattgt tatatattct ctatgtcgta 1260
ttcgtcttaa ggttgtcaga tgaatatatc gaccatgtta ggtatttaat ttatatgaat 1320
tgtattgcct agtcggccat attatgatta aaaaaaaaaa aaaaaaa 1367

```

<210>42

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer ThF3H-SalI-1

<400>42

```

ttctctgtcg acgcccattg cc 22

```

<210>43

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer ThF3H-SalI-2

<400>43

```

cgccgtgtcg actcgcttga ag 22

```

<210>44
<211>24
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer AmAS-INSITU-FW
<400>44
aattatttcc caatgttcaa aaat 24

<210>45
<211>21
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer AmAS-INSITU-RV
<400>45
tggagcttta ggtttgtgaa a 21

<210>46
<211>23
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer KIR-INSITU-FW
<400>46
atgggagaag aatacaagaa aac 23

<210>47
<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer KIR-INSITU-RV

<400>47

tcttacgata aaacaaactc a

21

<210>48

<211>19

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer T.F3H-923F

<400>48

atcatcgagc ggtggtgaa

19

<210>49

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer T.F3H-1339R

<400>49

tggccgacta ggcaatacaa t

21

<210>50

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer T.GAPDH-F87

<400>50

cccttctgtt tggtgaaaag cc

22

<210>51

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer T.GAPDH-R692

<400>51

cctcggattc ctccttgata gc

22

<210>52

<211>29

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer 417-NcoI

<400>52

cccatatata gccatggaag ataccatcg

29

<210>53

<211>26

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer 409 EcoRI

<400>53	
tagtggtgtg gagtcggggg atttcg	26
<210>54	
<211>21	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>Primer SWB DFR-1158F	
<400>54	
aatgggatgc ttccgacttc t	21
<210>55	
<211>21	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>Primer SWB DFR-1223R	
<400>55	
cagtggtttc tgccattgct t	21
<210>56	
<211>20	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>Probe SWB DFR-1180T	
<400>56	
aggaaaaaac aggctgaaaa	20

<210>57
<211>19
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer Torenia F3H-1035F
<400>57
catcgagcgg tggatgaatt

19

<210>58
<211>19
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer Torenia F3H-1101R
<400>58
ctggcgatgg gttttgaaa

19

<210>59
<211>19
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Probe Torenia F3H-1055T
<400>59
aaacacgaat agaattgtcg

19

<210>60
<211>22
<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer AmAS-1545F

<400>60

gaagatgacc ttgcggtgat tt

22

<210>61

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer AmAS-1638R

<400>61

ttgtcctctt cccctttata ggttt

25

<210>62

<211>26

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Probe AmAS-1582T

<400>62

agttcgccgg gagtttcgtg agtctg

26

<210>63

<211>17

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer AmGTcg12-908F

<400>63

ggttggcccg catttca

17

<210>64

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer AmGTcg12-966R

<400>64

tagaaaaccc tccggcagaa

20

<210>65

<211>17

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Probe AmGTcg12-929T

<400>65

agatggactt aaatgcg

17

<210>66

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer SWB GAPDH-794F

<400>66

gcattgagca agacgtttgt g 21

<210>67

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer SWB GAPDH-859R

<400>67

acgggaactg taacccatt c 21

<210>68

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Probe SWB GAPDH-816T

<400>68

agcttggtgc gtggtacg 18

<210>69

<211>2220

<212>DNA

<213>Linaria bipartita

<220>

<221>CDS

<222>(127)...(1488)

<223>Nucleotide sequence of cDNA encoding 4'CGT of linaria bipartita

<400>69

tggacactga catggactga aggagtagaa ataccaaaag ttttcaaact ctttattgca 60

atatacttgt acaaatctac tgcaactaaa acctattatt aattatatat ataccatat 120

ata gat atg gaa gat acc atc gta ttt tac act cca agc gat cac agt 168

Met	Glu	Asp	Thr	Ile	Val	Phe	Tyr	Thr	Pro	Ser	Asp	His	Ser			
1				5					10							
caa	ccc	aca	ata	gcg	ttg	gca	aag	ttc	atc	agc	aaa	cac	cac	cct	tcc	216
Gln	Pro	Thr	Ile	Ala	Leu	Ala	Lys	Phe	Ile	Ser	Lys	His	His	Pro	Ser	
15				20					25					30		
atc	tcc	atg	aca	atc	atc	agc	acc	gcc	gca	ttc	cct	tcg	tcc	gca	gcg	264
Ile	Ser	Met	Thr	Ile	Ile	Ser	Thr	Ala	Ala	Phe	Pro	Ser	Ser	Ala	Ala	
				35					40					45		
gtg	ctg	cct	aaa	aca	ata	agt	tac	cac	ccc	ctc	ccc	gcc	gtg	ccc	atg	312
Val	Leu	Pro	Lys	Thr	Ile	Ser	Tyr	His	Pro	Leu	Pro	Ala	Val	Pro	Met	
				50					55					60		
ccc	ccg	aac	ctc	tcc	tcc	aat	ccc	gtg	gaa	ttc	ctc	ttc	gaa	atc	ccc	360
Pro	Pro	Asn	Leu	Ser	Ser	Asn	Pro	Val	Glu	Phe	Leu	Phe	Glu	Ile	Pro	
				65					70					75		
cga	ctc	cac	aac	act	aaa	ctc	cgc	gaa	gca	ctc	gaa	aga	atc	tcc	gag	408
Arg	Leu	His	Asn	Thr	Lys	Leu	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Ile	Ser	Glu	
				80					85					90		
aca	tca	aag	atc	aag	gcg	ttg	gtt	atc	gat	ttc	ttt	tgc	aac	tcc	gct	456
Thr	Ser	Lys	Ile	Lys	Ala	Leu	Val	Ile	Asp	Phe	Phe	Cys	Asn	Ser	Ala	
				95					100					105		
ttc	gaa	gtt	tcc	agg	agc	ttg	aac	att	ccg	aca	ttc	ttc	gaa	gcc	agc	504
Phe	Glu	Val	Ser	Arg	Ser	Leu	Asn	Ile	Pro	Thr	Phe	Phe	Glu	Ala	Ser	
				115					120					125		
ctc	ggc	gcg	tcc	ggg	ctc	tgc	gag	ttt	ctc	tac	cac	ccg	aca	ttt	cac	552
Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Leu	Cys	Glu	Phe	Leu	Tyr	His	Pro	Thr	Phe	His	
				130					135					140		
aaa	acc	gtc	ccc	gga	gac	atc	gcg	gac	ttc	aac	gac	ttt	ctt	gaa	atc	600
Lys	Thr	Val	Pro	Gly	Asp	Ile	Ala	Asp	Phe	Asn	Asp	Phe	Leu	Glu	Ile	
				145					150					155		
ccg	ggg	tgc	cct	ccg	ctt	cac	tcg	gct	gat	gtc	cct	aag	ggt	ttg	ttc	648
Pro	Gly	Cys	Pro	Pro	Leu	His	Ser	Ala	Asp	Val	Pro	Lys	Gly	Leu	Phe	
				160					165					170		
cga	cgc	aag	act	att	gct	tac	aaa	cac	ttc	ctc	gac	act	gcc	aac	aac	696
Arg	Arg	Lys	Thr	Ile	Ala	Tyr	Lys	His	Phe	Leu	Asp	Thr	Ala	Asn	Asn	
				175					180					185		
atg	cgg	atg	tcg	agt	gga	atc	ctc	tta	cac	gcg	ttc	gat	gcg	ctt	gaa	744

Met Arg Met Ser Ser Gly Ile Leu Leu His Ala Phe Asp Ala Leu Glu	
195	200
tac cga gct aag gaa gct ttg tcc aac ggc ttg tgc aat ccg gac ggg	792
Tyr Arg Ala Lys Glu Ala Leu Ser Asn Gly Leu Cys Asn Pro Asp Gly	
210	215
cca act ccg cct gtt tac ttt gtt tcg cct act gtg gct gaa aca ttg	840
Pro Thr Pro Pro Val Tyr Phe Val Ser Pro Thr Val Ala Glu Thr Leu	
225	230
gca tac agg gaa aac acc gcc gcc ttg cgg cat gaa tgc ttg acg tgg	888
Ala Tyr Arg Glu Asn Thr Ala Ala Leu Arg His Glu Cys Leu Thr Trp	
240	245
ctt gat ttg cag cct gat aaa agc gtt atc ttc ctt tgt ttt gga agg	936
Leu Asp Leu Gln Pro Asp Lys Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg	
255	260
agg gga aca ttc tcc atg caa cag ttg cat gaa att gct gtc ggt ctt	984
Arg Gly Thr Phe Ser Met Gln Gln Leu His Glu Ile Ala Val Gly Leu	
275	280
gaa cgg agc ggg cga aga ttt ctc tgg gcc atc cgc agt agt ggg gca	1032
Glu Arg Ser Gly Arg Arg Phe Leu Trp Ala Ile Arg Ser Ser Gly Ala	
290	295
ggg aac ggt gag cct gac ttg agc gtg gtg ctg ccg gag ggt ttc ttg	1080
Gly Asn Gly Glu Pro Asp Leu Ser Val Val Leu Pro Glu Gly Phe Leu	
305	310
gag aga acc aaa gat att ggg ctg gtg ata acg aca tgg gcg ccg cag	1128
Glu Arg Thr Lys Asp Ile Gly Leu Val Ile Thr Thr Trp Ala Pro Gln	
320	325
aaa gag gtg tta agc cat gtg gcc gtg tgt gga ttt gtg acg cac tgc	1176
Lys Glu Val Leu Ser His Val Ala Val Cys Gly Phe Val Thr His Cys	
335	340
ggc tgg aac tca gtt ctc gag gcg gtg tcg ttt ggg gtt ccg atg att	1224
Gly Trp Asn Ser Val Leu Glu Ala Val Ser Phe Gly Val Pro Met Ile	
355	360
ggg tgg ccg ctg tac gca gag cag agg atg aat cgg gtg ttt atg gtg	1272
Gly Trp Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Arg Val Phe Met Val	
370	375
gag gaa ata aag gtg gca ttg cct ttg gag gag gag gcg gat ggg ttg	1320

Glu Glu Ile Lys Val Ala Leu Pro Leu Glu Glu Glu Ala Asp Gly Leu
 385 390 395
 gtg agg gcg aca gaa ttg gag aag cgg gtg aga gag ttg acc gag tcc 1368
 Val Arg Ala Thr Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Glu Leu Thr Glu Ser
 400 405 410
 gtg agg gga aaa gcg gta agc cgg cgg gtg gag gaa atg aga ctc tcg 1416
 Val Arg Gly Lys Ala Val Ser Arg Arg Val Glu Glu Met Arg Leu Ser
 415 420 425 430
 gca gag aag gcc gtg agc aag ggt gga acg tcg ctg att gca ttg gag 1464
 Ala Glu Lys Ala Val Ser Lys Gly Gly Thr Ser Leu Ile Ala Leu Glu
 435 440 445
 aaa ttc atg gac tcg att act cta taagcgtaag agttgctata aatttagcta 1518
 Lys Phe Met Asp Ser Ile Thr Leu
 450
 tgttgcacgg atacgtcaaa taaaccttgc tcgtattcctt agatacgtat actatacaaa 1578
 tacaatttat gaataagttt ttcatatggc gtatgaagta ttctaattaa attaaataac 1638
 acgttttgaa gcgttattat aagggcgtaa ctagtaaata ataagaaata attaaacaaa 1698
 aaaaaattat gatgttaatg ataattttat taatatttta tactataaag ttcttaatat 1758
 tcttgttgat atgtaagttt attatataag tattttaagt gttttatttg gtattttgaa 1818
 ttttaagtacc atcgtggaat acttttataat gagcttataa ttttaagtgt gaatagattt 1878
 catattaata tgttattatt tatgtgaaca aaaaatatta ttgctcaagt tattttgaat 1938
 tatattttta tatatataag tatttgatat aaaatatatta acgtattatg tgcgtatcct 1998
 tattttacaa agttaccgtg attcgtttca tgtttgatac attttttcat attcgtatat 2058
 gtgcccgtgt ccggtgaata tagtaaatta gttatgggtat gtgatgtttc tatgttgtaa 2118
 caaaataatg gtacttaatt tgaatagtcc agtcaagtat ttgtaagtgt aaattaatat 2178
 tccatttaat attccattat tctctcaaaa aaaaaaaaaa aa 2220

<210>70

<211>454

<212>PRT

<213>Linaria bipartita

<220>

<223>Amino acid sequence of 4'CGT of linaria bipartita

<400>70

Met Glu Asp Thr Ile Val Phe Tyr Thr Pro Ser Asp His Ser Gln Pro
 1 5 10 15

Thr Ile Ala Leu Ala Lys Phe Ile Ser Lys His His Pro Ser Ile Ser
 20 25 30
 Met Thr Ile Ile Ser Thr Ala Ala Phe Pro Ser Ser Ala Ala Val Leu
 35 40 45
 Pro Lys Thr Ile Ser Tyr His Pro Leu Pro Ala Val Pro Met Pro Pro
 50 55 60
 Asn Leu Ser Ser Asn Pro Val Glu Phe Leu Phe Glu Ile Pro Arg Leu
 65 70 75 80
 His Asn Thr Lys Leu Arg Glu Ala Leu Glu Arg Ile Ser Glu Thr Ser
 85 90 95
 Lys Ile Lys Ala Leu Val Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ser Ala Phe Glu
 100 105 110
 Val Ser Arg Ser Leu Asn Ile Pro Thr Phe Phe Glu Ala Ser Leu Gly
 115 120 125
 Ala Ser Gly Leu Cys Glu Phe Leu Tyr His Pro Thr Phe His Lys Thr
 130 135 140
 Val Pro Gly Asp Ile Ala Asp Phe Asn Asp Phe Leu Glu Ile Pro Gly
 145 150 155 160
 Cys Pro Pro Leu His Ser Ala Asp Val Pro Lys Gly Leu Phe Arg Arg
 165 170 175
 Lys Thr Ile Ala Tyr Lys His Phe Leu Asp Thr Ala Asn Asn Met Arg
 180 185 190
 Met Ser Ser Gly Ile Leu Leu His Ala Phe Asp Ala Leu Glu Tyr Arg
 195 200 205
 Ala Lys Glu Ala Leu Ser Asn Gly Leu Cys Asn Pro Asp Gly Pro Thr
 210 215 220
 Pro Pro Val Tyr Phe Val Ser Pro Thr Val Ala Glu Thr Leu Ala Tyr
 225 230 235 240
 Arg Glu Asn Thr Ala Ala Leu Arg His Glu Cys Leu Thr Trp Leu Asp
 245 250 255
 Leu Gln Pro Asp Lys Ser Val Ile Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly
 260 265 270
 Thr Phe Ser Met Gln Gln Leu His Glu Ile Ala Val Gly Leu Glu Arg
 275 280 285
 Ser Gly Arg Arg Phe Leu Trp Ala Ile Arg Ser Ser Gly Ala Gly Asn
 290 295 300

Gly Glu Pro Asp Leu Ser Val Val Leu Pro Glu Gly Phe Leu Glu Arg
 305 310 315 320
 Thr Lys Asp Ile Gly Leu Val Ile Thr Thr Trp Ala Pro Gln Lys Glu
 325 330 335
 Val Leu Ser His Val Ala Val Cys Gly Phe Val Thr His Cys Gly Trp
 340 345 350
 Asn Ser Val Leu Glu Ala Val Ser Phe Gly Val Pro Met Ile Gly Trp
 355 360 365
 Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Arg Met Asn Arg Val Phe Met Val Glu Glu
 370 375 380
 Ile Lys Val Ala Leu Pro Leu Glu Glu Glu Ala Asp Gly Leu Val Arg
 385 390 395 400
 Ala Thr Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Glu Leu Thr Glu Ser Val Arg
 405 410 415
 Gly Lys Ala Val Ser Arg Arg Val Glu Glu Met Arg Leu Ser Ala Glu
 420 425 430
 Lys Ala Val Ser Lys Gly Gly Thr Ser Leu Ile Ala Leu Glu Lys Phe
 435 440 445
 Met Asp Ser Ile Thr Leu
 450

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019461

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/10, A01H5/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/54, C12N9/10, A01H5/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenBank/EMBL/DDBJ/Swissprot/PIR/GeneSeq,
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Fukuchi-MIZUTANI M. et al., Biochemical and molecular characterization of a novel UDP-glucose: anthocyanin 3'-O-glucosyltransferase, a key enzyme for blue anthocyanin biosynthesis, from gentian, Plant Physiol., 2003 July, Vol.132, pages 1652 to 1663	1-20
A	WO 00/49155 A1 (Suntory Ltd.), 24 August, 2000 (24.08.00), & EP 1072684 A1 & US 6770747 B1 & AU 2000/25722 A & NZ 507563 A	1-20
P, A	WO 2004/018682 A1 (Suntory Ltd.), 04 March, 2004 (04.03.04), (Family: none)	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 March, 2005 (03.03.05)

Date of mailing of the international search report
22 March, 2005 (22.03.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/54, C12N9/10, A01H5/02		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/54, C12N9/10, A01H5/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) GenBank/EMBL/DDBJ/Swissprot/PIR/GeneSeq WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Fukuchi-Mizutani M. et. al., Biochemical and molecular characterization of a novel UDP-glucose:anthocyanin 3'-O-glucosyltransferase, a key enzyme for blue anthocyanin biosynthesis, from gentian, Plant Physiol., 2003 Jul, Vol. 132, p. 1652-1663	1-20
A	WO 00/49155 A1 (サントリー株式会社) 2000.08.24 & EP 1072684 A1 & US 6770747 B1 & AU 2000/25722 A & NZ 507563 A	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 03.03.2005	国際調査報告の発送日 22.3.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 深草 亜子	4 B 9548
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2004年1月)